

Zelllinienentwicklung zur Verbesserung der Expression rekombinanter Glykoproteine für die Kristallisation

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Katharina Karste
aus Wernigerode

1. Referent: Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent: Professor Dr. Wulf Blankenfeldt
Eingereicht am: 31.05.2017
Mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.10.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge und Seminarvorträge

Katharina Karste, Steffen Meyer, Sonja Wilke, Konrad Büssow und Joop van den Heuvel. Development of New Tools for Production and Isolation of Multi-Protein Complexes, Progress Seminar, Braunschweig (2015).

Katharina Karste, Steffen Meyer, Sonja Wilke, Konrad Büssow und Joop van den Heuvel. Structural biology – a power of endurance, 7th Annual Retreat HZI Grad School, Goslar-Hahnenklee (2016).

Posterbeiträge

Katharina Karste, Steffen Meyer, Sonja Wilke, Konrad Büssow und Joop van den Heuvel. Improvement of Mammalian Cell Lines for Recombinant Protein Expression for Structural Biology, 9th International PhD Symposium, Braunschweig (2016).

Katharina Karste, Steffen Meyer, Sonja Wilke, Konrad Büssow und Joop van den Heuvel. Development of New Tools for Production and Isolation of Multi-Protein Complexes, 8th International PhD Symposium, Braunschweig (2015).

Katharina Karste, Steffen Meyer, Sonja Wilke, Konrad Büssow und Joop van den Heuvel. Development of New Tools for Production and Isolation of Multi-Protein Complexes, 6th Annual Retreat HZI Grad School, Braunschweig (2015).

Katharina Karste, Steffen Meyer, Sonja Wilke, Konrad Büssow und Joop van den Heuvel. Development of New Tools for Production and Isolation of Multi-Protein Complexes, 6th International PhD Symposium, Braunschweig (2013).

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungen | IV |
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 3 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Rekombinante Proteinexpression | 5 |
| 1.2 Säugerzellkulturen | 6 |
| 1.2.1 Transiente Proteinexpression in HEK293-Zellen | 7 |
| 1.2.2 Stabile Proteinexpression in CHO-Zelllinien | 10 |
| 1.3 Zelllinienentwicklung durch die "Tag- und Targeting-Strategie" | 14 |
| 1.3.1 Der Rekombinase gesteuerte Kassettenaustausch (RMCE) | 18 |
| 1.3.2 „Genome Editing“ mit Hilfe sequenzspezifischer Nukleasen | 20 |
| 1.4 Die Rolle von N-Glykosylierungen für die Kristallisation | 29 |
| 1.4.1 Expressionssysteme für die Herstellung von Glykoproteinen | 31 |
| 1.4.2 Inhibitoren und glykosylierungsdefiziente Zelllinien | 32 |
| 1.5 Multi-Host Vektorsystem | 34 |
| 1.6 Modelproteine | 36 |
| 1.6.1 Fluoreszierende Proteine | 36 |
| 1.6.2 Hämagglutinin H1 von Influenza A | 40 |
| 2. Material und Methoden | 43 |
| 2.1 Geräte | 43 |
| 2.2 Chemikalien, Kits und Reagenzien | 45 |
| 2.2.1 Enzyme und Standards für Molekulargewichte | 45 |
| 2.2.2 Kulturmedien und Zusätze | 46 |
| 2.2.3 Transfektionsreagenzien | 47 |
| 2.3 Plasmide und Oligonukleotide | 47 |
| 2.4 Bakterienstamm und Zelllinien | 49 |
| 2.4.1 Bakterienstamm | 49 |
| 2.4.2 Zelllinien | 50 |
| | I |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.5 | Molekularbiologische Methoden | 50 |
| 2.5.1 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 50 |
| 2.5.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 52 |
| 2.5.3 | DNA-Extraktion | 53 |
| 2.5.4 | DNA-Restriktionsverdau | 53 |
| 2.5.5 | Ligation von DNA-Fragmenten | 54 |
| 2.5.6 | Elektrotransformation | 54 |
| 2.5.7 | Kultivierung von Bakterienkulturen | 54 |
| 2.5.8 | Plasmidpräparation | 55 |
| 2.5.9 | Präparation genomischer DNA | 55 |
| 2.5.10 | Photometrische Quantifizierung von DNA und Proteinen | 55 |
| 2.6 | Zellkultur | 56 |
| 2.6.1 | Kultivierung von Säugerzellen | 56 |
| 2.6.2 | Bestimmung der Zellzahl und Viabilität | 57 |
| 2.6.3 | Kryokonservierung | 57 |
| 2.6.4 | Revitalisierung | 58 |
| 2.6.5 | Transfektion von Säugerzellen | 58 |
| 2.6.6 | Durchflusszytometrie und präparative Zellsortierung | 59 |
| 2.6.7 | Generierung der verbesserten CHO-Masterzelllinie | 62 |
| 2.6.8 | Generierung der HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie | 62 |
| 2.6.9 | Generierung von Produzentenzelllinien mittels RMCE | 63 |
| 2.6.10 | Einzelzellklonierung | 64 |
| 2.7 | Proteinproduktion und Reinigung | 64 |
| 2.7.1 | Transiente Proteinexpression in HEK293-6E | 64 |
| 2.7.2 | Aufkonzentrieren von Proteinen mittels VivaSpin | 65 |
| 2.7.3 | Aufreinigung mit magnetischen Beads | 65 |
| 2.7.4 | Trichloressigsäure (TCA)-Fällung | 65 |
| 2.7.5 | Affinitätschromatographie | 66 |
| 2.7.6 | Gelfiltration | 67 |
| 2.7.7 | Kristallisation | 68 |
| 2.8 | Proteinanalyse | 70 |
| 2.8.1 | SDS-PAGE | 70 |
| 2.8.2 | Westernblot und Immunfärbung | 71 |
| 2.8.3 | MALDI-TOF | 72 |

| | |
|--|------------|
| 3. Ergebnisse | 74 |
| 3.1 Generation neuer RMCE CHO Lec3.2.8.1 Masterzellen | 74 |
| 3.2 Klonierung des neuen Tagging- Vektors pSV40-FS-HTG-dpuro | 76 |
| 3.3 Generierung der neuen CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzelllinie | 79 |
| 3.4 Test auf Langzeitstabilität | 80 |
| 3.5 Überprüfung der Integrität der Tagging-Kassette | 81 |
| 3.6 Erhöhung der RMCE vermittelten Austauscheffizienz | 82 |
| 3.7 Nachweis der Austauschbarkeit der Tagging-Kassette | 84 |
| 3.8 Herstellung der HEK293-6E MGAT1 Knockout-Zelllinie | 87 |
| 3.9 Untersuchung der N-Glykosylierungen | 92 |
| 3.10 Reinigung von H1 und Kristallisation | 98 |
| 4. Diskussion | 103 |
| 4.1 Generation verbesserter CHO Lec3.2.8.1 RMCE Masterzellen | 103 |
| 4.2 Isolation stabil exprimierender Zellklone | 104 |
| 4.3 Erhöhung der Austauscheffizienz und Isolation der Produzenten-zellen nach RMCE | 107 |
| 4.4 CRISPR/Cas9 gesteuerter MGAT1-Knockout in HEK293-6E-Zellen | 108 |
| 4.5 Produktion und Aufreinigung von Hämagglutinin H1 | 111 |
| Ausblick | 113 |
| Literatur | 115 |
| Danksagung | 137 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|---|
| AS | Aminosäure |
| Amp | Ampicillin |
| ATG | Translationsstart |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphat |
| BD | Becton Dickinson |
| BEVS | Baculovirus Expression Vector System |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| bp | Basenpaar |
| CHO | <i>Chinese Hamster Ovary</i> |
| CMV | Cytomegalovirus |
| Cre | causes recombination |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| ddH ₂ O | H ₂ O bidest. |
| DHFR | Dihydrofolatreduktase |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| dTomato | Dimer-Tomato |
| ϵ | Extinktionskoeffizient [$l \times g^{-1} \times cm^{-1}$] |
| EBNA1 | Epstein-Barr nukleäres Antigen 1 |
| EBV | Epstein-Barr Virus |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EF1 α | elongation factor 1 α |
| Endo | Endoglykosidase |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |

| | |
|-------|--|
| EtOH | Ethanol |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| Flp | Flippase |
| for | forward (Primer) |
| FR | family of repeats |
| FRT | Flippase Erkennungssequenzen |
| FSC | Forward Scatter |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GNT-I | N-Acetylglucosaminyltransferase I |
| GOI | Gene of Interest |
| GS | Glutaminsynthase |
| HDR | homology directed repair |
| HEK | <i>Human Embryonic Kidney</i> |
| HJ | Holiday Junction |
| hpi | engl. hours post infection |
| hpt | engl. hours post transfection |
| HZI | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung |
| IMAC | immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| Kan | Kanamycin |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Lysogeny Broth |
| M | Marker (Größenstandard) |
| MALDI | Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation |
| MCS | Polylinker; Multiple Cloning Site |
| MeOH | Methanol |
| MGAT1 | Mannosyl (α -1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase |

| | |
|-------|---|
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | Molekulargewicht |
| MWCO | Molekulargewicht Ausschlussgrenze |
| N | Asparagin |
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| Neo | Neomycinphosphotransferase |
| NHEJ | Non-Homologous End-Joining |
| ü.N. | über Nacht |
| ORF | offenes Leseraster |
| oriP | Replikationsursprung |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEI | Polyethylenimin |
| PGK | Phosphoglyceratkinase |
| PI | Propidiumiodid |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| polyA | Polyadenylierungssignal |
| PTM | post-translationale Modifikation |
| Puro | Puromycin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| rev | reverse (Primer) |
| RMCE | Rekombinase-gesteuerter Kassettenaustausch |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| sc | single chain |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| S/MAR | Scaffold/ Matrix Attachment Regions |

| | |
|----------------|--|
| SOC | Super optimal broth for catabolite repression |
| SSC | Sideward scatter |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TALEN | Transcription Activator-Like Effector Nuclease |
| TBS-T | Tris gepufferte Salzlösung mit Tween-20 |
| tdTomato | Tandem Dimer Tomato |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| T _m | Schmelztemperatur |
| Tn7 | Bakterielles Transposon Tn7 |
| TOF | Time of flight |
| Tris | 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol |
| U | katalytische Einheit |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumenfraktion (volume per volume) |
| w/v | Massekonzentration (weight per volume) |
| ZNF | Zinkfinger |

Zusammenfassung

Glykoproteine spielen im menschlichen Körper eine bedeutende Rolle, da sie bei einer Vielzahl an zellulären Prozessen entscheidende Funktionen ausüben, u.a. bei der Immunantwort, der Zellkommunikation oder der Blutgerinnung. Diese Makromoleküle sind insbesondere für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse, da sie wichtige „Drug Targets“ bei der Entwicklung neuer Medikamente darstellen. Um jedoch neue Wirkstoffe entwickeln zu können, sind detaillierte Informationen über die Struktur und Funktionsweise beteiligter Glykoproteine bei der Entstehung von Krankheiten (z.B. Stoffwechselstörungen, Krebs o.Ä.) oder von Infektionen mit schwerwiegenden Krankheitserregern notwendig. Für genauere Untersuchungen müssen die Proteine in ausreichender Menge und Qualität zur Verfügung stehen. Hierbei ist v.a. die Wahl eines geeigneten Expressionssystems besonders wichtig. Die Produktion korrekt glykosylierter Proteine erfordert die Verwendung eukaryotischer Systeme, da diese in der Lage sind posttranslationale Modifikationen und komplexe Faltungen vorzunehmen. Die dabei am häufigsten zum Einsatz kommenden Zelllinien sind die *Human Embryonic Kidney*- (HEK293) und die *Chinese Hamster Ovary*- (CHO) Zelllinie.

Dabei kann die rekombinante Proteinexpression auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Einmal transient oder durch die Erzeugung einer stabilen Zelllinie, bei der das Transgen im Genom der Wirtszelle integriert vorliegt. Beide Systeme haben ihre Vor- und Nachteile bezogen auf den erforderlichen Zeit- und Arbeitsaufwand bis zum fertigen Produkt, der Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses und der Ausbeute an exprimiertem Protein. Um Aussagen über die komplexe Raumstruktur eines Proteins treffen zu können bedient man sich in der Regel der Röntgenstrukturanalyse. Hierfür muss das Protein in Form eines Kristalls vorliegen. Dies erfordert das Vorhandensein von hochreinem, löslichem und homogenem Protein, was sich insbesondere bei Glykoproteinen durch den heterogenen Charakter der komplexen Glykanseitenketten als schwierig erweisen kann.

Ziel dieser Arbeit war es eine HEK293-6E Glykosylierungsmutante durch den CRISPR/Cas9 vermittelten Knockout des MGAT1-Gens zu generieren, welches für die Erzeugung komplexer N-Glykosylierungen verantwortlich ist. Diese neuartige Zelllinie sollte durch den veränderten Glykosylierungsstoffwechsel die Produktion und Kristallisation von Glykoproteinen ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung zweier spezifischer gRNAs eine ~400 bp große Deletion im MGAT1-Lokus erzielt werden konnte, wodurch eine vollständige Genstilllegung resultierte. Am Beispiel der Produktion des Oberflächenproteins Hämagglutinin H1 des Influenza A Virus konnte das verkürzte Glykosylierungsmuster des Mannose-reichen Glykantyps nachgewiesen werden.

Hierdurch waren die stabile Reinigung von H1 und eine anschließende Kristallisation möglich.

Der Zeit- und Arbeitsaufwand für die Erzeugung stabiler Produktionszelllinien, welche eine hohe und langzeitstabile Transgenexpression ermöglichen, ist immens und kann teilweise 6 - 12 Monate in Anspruch nehmen. Die Verwendung einer sogenannten „Masterzelllinie“, welche über eine austauschbare Genkassette in einem hochexprimierenden Genlokus verfügt, kann diesen Prozess erheblich verkürzen. Infolge des Rekombinase vermittelten Kassettenaustauschs (RMCE) ist es möglich jedes beliebige GOI schnell und einfach in das Genom der Zelle einzubringen und in vorhersagbarer Menge stabil zu exprimieren.

Die existierende Masterzelllinie SMT_dneo(2)_24 basiert auf der glykosylierungsdefizienten CHO Lec3.2.8.1 Zelllinie und wurde bereits erfolgreich für die Produktion und Kristallisation verschiedener Proteine eingesetzt. In der Praxis erweist sich diese Zelllinie jedoch oft schwierig zu handhaben. Insbesondere der Selektionsprozess der ausgetauschten Produktionszellen gestaltet sich als arbeitsintensiv und wenig vorhersagbar. Zusätzlicher Screeningaufwand, um den Erfolg des Austauschereignisses zu überprüfen, führt zu einer unnötigen Verlängerung der Zeit bis zur Etablierung der Produktionszelllinie.

Um die Robustheit des Systems zu erhöhen und den Zeit- und Arbeitsaufwand so gering wie möglich zu gestalten, sollte in dieser Arbeit eine neue verbesserte RMCE-Masterzelllinie geschaffen werden. Hierzu wurde zunächst ein neuer Tagging-Vektor mit verbesserten Eigenschaften generiert, welcher den Selektionsprozess nach der Austauschreaktion durch die Möglichkeit einer Doppelselektion stark vereinfachen und beschleunigen sollte. Durch eine Kombination aus Antibiotikaselektion und mehreren Runden FACS-Sortierungen wurden anschließend die Masterzellklone isoliert, welche eine hohe und langzeitstabile Expression des, als Teil des Fusionsproteins HTG, vorliegenden Reporterproteins GFP ermöglichten. Die Vollständigkeit der Genkassette konnte mit Hilfe der genomischen PCR nachgewiesen werden. In einer ersten Austauschreaktion mit dem Reporterprotein tdTomato wurde gezeigt, dass die Genkassette effizient austauschbar ist und Expressionslevel erzielt werden können, welche mit der ursprünglichen Masterzelllinie vergleichbar sind.

Summary

Glycoproteins play a major role in the human body due to their important functions during a multitude of cellular processes, e.g. immune response, cell communication or blood coagulation. These macromolecules are of big interest especially for the pharmaceutical industry as they represent an important class of drug targets. For the development of new active substances there is a need for detailed information about the structure and function of glycoproteins which are involved in the formation of diseases (e.g. metabolic disorders, cancer) or infections caused by serious pathogens. For precise structural analysis proteins have to be available in sufficient amounts and quality. The choice of the right expression system has a great influence. Due to their capability of post-translational modifications and complex folding, eukaryotic systems are applied. The most common cell lines are the *human embryonic kidney*- (HEK293) and the *chinese hamster ovary*- (CHO) cell line. Protein expression can be carried out in two different ways. First, transient protein expression systems can be applied or second, a stable cell line where the transgene is integrated into the genome can be generated to express the recombinant protein. Both systems have their advantages and disadvantages relating to the time-, scale- and labor effort until the product is ready to use, the reproducibility of the manufacturing process and the achievable yield of expressed protein. To determine the three dimensional structure of a certain protein often X-Ray crystallographic analysis is utilized. The ability of the proteins to provide diffracting crystals is an absolute requirement for this method. Therefore, the generation of pure, soluble and homogenous protein is essential, which can however be problematic due to the heterogeneous character of the complex glycan side chains of glycoproteins.

A major goal of this work was the establishment of a HEK293-6E glycosylation mutant cell line via CRISPR/Cas9 driven knockout of the MGAT1-gene regulating the formation of complex N-glycosylation. This novel cell line should then be used for the transient expression of sufficient amounts of recombinant proteins with truncated and homogeneous N-glycosylation patterns for successful protein crystallization. By application of two specific gRNAs a fragment with a size of ~400 bp could be deleted from the MGAT1-locus which leads to the total loss of MGAT1 activity. On the example of the Influenza A surface glycoprotein hemagglutinin H1 the truncated glycosylation pattern of the high-mannose type could be proved. Hereby, the stable purification of H1 and a subsequent crystallization was possible.

The time- and labor effort for the establishment of a stable cell line supporting a high and longtime stable transgene expression is immense and can last 6 – 12 month in total. The application of a so called “master cell line” harboring an exchangeable gene cassette in a high expressing locus can reduce this time remarkably. The recombinase

mediated cassette exchange (RMCE) allows the fast and easy introduction of any GOI at highly expressible loci for stable production of predictable amounts of protein.

The existing master cell line SMT_dneo(2)_24 is generated from the glycosylation mutant CHO Lec3.2.8.1 cell line and could already be used successfully for the production and crystallization of several proteins. However, in practice this cell line turns out to be difficult to handle. Particularly, the selection process of the exchanged production cells is labor-intensive and less predictable. Additional screening effort to test for successful exchange reactions extended the time until the production cell line was successfully isolated. To increase the robustness of the system and to decrease the time- and labor effort to a minimum, a new improved RMCE master cell line should be generated in this work. Therefore a new tagging-vector was established with improved properties to simplify and accelerate the selection process after the exchange reaction due to double selection. A combination of antibiotic selection and several rounds of FACS sorting steps was used to isolate master cell clones supporting high and stable expression of the reporter protein GFP which is part of the fusion gene HTG. The integrity of the gene cassette could be validated by genomic PCR. In a first exchange reaction with the reporter protein tdtomato the ability to replace the gene cassette could be shown and furthermore comparable expression levels like the original master cell line could be reached.

1. Einleitung

1.1 Rekombinante Proteinexpression

Proteine sind komplexe Makromoleküle, die in allen Lebewesen essentielle Funktionen in zellulären Prozessen ausüben. So verleihen Proteine der Zelle nicht nur ihre Struktur, sondern sind darüber hinaus u.a. auch beteiligt an der Zellteilung, der DNA-Replikation, dem Transport, der Katalyse biochemischer Reaktionen oder der Immunantwort (Sawin and Scholey, 1991; Cooper, 2000; Rudd *et al.*, 2001). Fehlfaltungen von Proteinen können Ursache schwerer degenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Diabetes sein (Reynaud *et al.* 2010). Genetische Mutationen können je nach Schweregrad zu Funktionsverlusten der Zelle und somit zu schweren Stoffwechselstörungen wie z.B. der Phenylketonurie (Blau, van Spronsen and Levy, 2010) führen. Kommt es hingegen zu einer Deregulation der Homöostase können Krebs (Vogelstein and Kinzler, 2004) oder Autoimmunerkrankungen (Aaltonen *et al.*, 1997) die Folge sein.

Der große Fortschritt in der molekularen Zellbiologie und Biotechnologie durch die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie (Cohen *et al.*, 1973) machte es 1979 erstmals möglich, das humane Protein Insulin mit Hilfe von gentechnisch veränderten Bakterien (*Escherichia coli*) herzustellen (Goeddel *et al.*, 1979). 1982 wurde es als erstes rekombinant produziertes Medikament von der Food and Drug Administration (FDA) auf dem US-amerikanischen Markt zugelassen. Von nun an mussten Proteine nicht durch die zeitintensive Extraktion aus natürlichen Quellen isoliert, sondern konnten in großen Mengen schnell und kostensparend produziert werden. Darüber hinaus ermöglichte die neue rekombinante DNA-Technologie durch genetische Modifikationen eine gezielte Manipulation der Proteineigenschaften. Sie wird heutzutage u.a. dafür eingesetzt die Löslichkeit und Exprimierbarkeit von Proteinen zu erhöhen, oder durch das Anbringen von zusätzlichen DNA-Sequenzen („Protein-Tags“) die Aufreinigung zu erleichtern (Arnau *et al.*, 2006). Durch die Optimierung der post-translationalen Modifikationen können darüber hinaus die Lebenszeit, Stabilität (Fágáin, 1995) oder Aktivität von Proteinen beeinflusst werden. Mittlerweile können sogar vollkommen neuartige Proteine hergestellt werden, welche in der Natur nicht vorkommen, wie z.B. bispezifische Antikörper (Fan *et al.*, 2015).

Die steigende Nachfrage nach verbesserten Medikamenten stellt Strukturbiologen vor immer anspruchsvollere Aufgaben. Komplexe Proteinstrukturen, die über post-translationalen Modifikationen verfügen oder molekulare Chaperone bzw. Kofaktoren zur Stabilität, Faltung oder enzymatischen Aktivität benötigen, können von bakteriellen Expressionssystemen nur unzureichend hergestellt werden. Für die Untersuchung von Transmembranproteinen, Proteinen des Zellkerns, der Zell-

oberfläche oder sekretierten Proteinen, welche einen komplexen Faltungsapparat benötigen, gelangen eukaryotische Expressionssysteme immer stärker in den Fokus. Nicht alle dieser Expressionssysteme sind dabei für strukturebiologische Fragestellungen geeignet, da sie entweder sehr kostspielig oder arbeitsintensiv sind. Sie unterscheiden sich u.a. in der Expressionsstrategie, als auch in der zu erzielenden Proteinqualität und Ausbeute (Hunt, 2005). Gerade für die Kristallisation müssen Proteine in hoher Reinheit und Homogenität vorliegen, um gut streuende Kristalle zu erhalten. Komplexe Proteinglykosylierungen eukaryotischer Expressionssysteme können dabei die Bildung von Kristallen verhindern oder stören. Auch die Ausbeute, die mit Expressionssystemen höherer Organismen erzielt werden kann, ist meist gering im Vergleich zu *E.coli*. Während die Kultivierung von Hefen noch relativ preiswert ist, sind die benötigten Medien für Säugerzellen sehr kostenintensiv. Um ausreichende Mengen rekombinanter Proteine kontinuierlich herstellen zu können, werden stabile Zelllinien verwendet, dessen Generierung sehr viel Zeit in Anspruch nehmen kann (Wurm, 2004). Die Wahl des geeigneten Expressionssystems im Hinblick auf Qualität und Reinheit des zu untersuchenden Proteins muss hierbei genau abgewogen und experimentell verglichen werden, um das optimale System herauszufinden. Die Entwicklung neuer Transfektionsmethoden, verbesserter Produktionsprozesse oder die Generierung gentechnisch veränderter Zelllinien stellt einen weltweiten Wettstreit der biotechnologischen Forschung dar.

1.2 Säugerzellkulturen

Je nach Komplexität der rekombinanten Proteine kommen unterschiedliche Expressionssysteme zur Anwendung. Das Bakterium *E. coli* ist für einfache Proteine das meist verbreitetste Expressionssystem. Es lässt sich einfach handhaben, stellt wenig Anforderungen an das Nährmedium, erreicht hohe Zelldichten und produziert große Mengen an Protein (Rosano and Ceccarelli, 2014). Es ist jedoch nicht in der Lage posttranslationale Modifikationen, insbesondere Glykosylierungen, vorzunehmen. Viele Proteine können nicht korrekt gefaltet oder sekretiert werden. Sie sind nicht funktional, sammeln sich innerhalb der Zelle an und verklumpen (*inclusion bodies*). Für sehr große und komplexe Proteine mit posttranslationalen Modifikationen eignen sich am besten eukaryotische Expressionssysteme, wie Hefen, Insekten- oder Säugerzellen. All diese Expressionssysteme haben ihre Vor- und Nachteile in Bezug auf Kultivierungsbedingungen, Proteinausbeute oder erzeugte Glykosylierungsmuster. Für die Expression menschlicher Proteine mit komplexen Glykosylierungen eignen sich besonders Säugerzellen wie *Chinese Hamster Ovary* (CHO) oder *Human Embryonic Kidney* (HEK), da sie dem menschlichen Organismus am ähnlichsten sind. 70 % aller rekombinanten Therapeutika stammen von Säugerzellen, in erster Linie CHO-Zellen (K. P. Jayapal *et*

al., 2007). Insbesondere die PTMs (post-translationale Modifikationen) entscheiden über korrekte Faltung, Funktionalität, Stabilität, aber auch Immunogenität eines Proteins (Dalton and Barton, 2014; Kuriakose, Chirmule and Nair, 2016). Dies spielt u.a. für die therapeutische Anwendung eine Rolle. Hier ist die korrekte Faltung und Glykosylierung entscheidend für die biologische und pharmakologische Aktivität der Zielproteine. Säugerzellen sind jedoch wesentlich anspruchsvoller hinsichtlich ihrer Kultivierung als Bakterien. Neben langsameren Wachstumsraten und niedrigeren Zelldichten, benötigen sie komplexe Nährmedien u.a. bestehend aus Vitaminen, Mineralsalzen, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren, pH-Indikatoren und Antibiotika. Obwohl Säugerzellen in der Regel deutlich geringere Produktausbeuten erzielen als Bakterien oder Hefen, ist es in den letzten 20 Jahren durch Zelllinienentwicklung, Hochdurchsatzverfahren, Medienzusammensetzung und Prozesskontrolle gelungen, Ausbeuten im Gramm pro Liter Bereich zu erzielen (Andersen and Krummen, 2002; Wells and Robinson, 2017).

Dabei werden zwei verschiedene Strategien bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in Säugerzellen unterschieden; die transiente und stabile Expression. Die Wahl des Expressionssystems hängt dabei von den Eigenschaften und der beabsichtigten Anwendung des Zielproteins ab (Brondyk, 2009). Die stabile Expression wird bevorzugt, wenn Wachstumsverhalten der Wirtszelle, Klonalität, Stabilität oder Reproduzierbarkeit des Verfahrens von Bedeutung sind. Dies ist u.a. relevant für die Produktion von Proteinen für die Kristallisation, für biochemische Assays oder in der pharmazeutischen Industrie. Dient die Produktion rekombinanter Proteine v.a. Forschungszwecken wie z.B. Hochdurchsatzverfahren oder Testexpressionen verschiedener Genkonstrukte, wird die transiente Expression bevorzugt, da sie in der Regel kostengünstig, einfach durchzuführen und schnell ist. Die dabei bevorzugte Zelllinie ist die HEK293-Zelllinie (Dyson, 2016).

1.2.1 Transiente Proteinexpression in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen stammen aus einer humanen embryonalen Nierenzelllinie epithelialen Ursprungs (*Human Embryonic Kidney*). Diese wurde mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 transfiziert (Graham *et al.*, 1977), wodurch große Teile des Virus in das Genom integriert wurden. Sie eignen sich u.a. für die Vermehrung von Adenoviren. Später wurde diese Zelllinie weiter modifiziert. Die HEK293T Zelllinie exprimiert zusätzlich das „SV40 large T-Antigen“ (Lebkowski, Clancy and Calos, 1985), welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem "SV40 origin of replication" ermöglicht. Die HEK293-EBNA Zelllinie exprimiert das Epstein-Barr Virus nukleäre Antigen 1 (EBNA1) des gleichnamigen Virus (EBV) und sorgt für die episomale Vermehrung von Vektoren, welche den oriP von EBV enthalten.

HEK293 Zellen eignen sich besonders gut für die transiente Expression, da sie sich sehr leicht mit Plasmid-DNA transfizieren lassen, in Suspension wachsen können und sich leicht an serumfreies Medium adaptieren lassen. Dabei kann die transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat (Meissner *et al.*, 2001), kationischen Liposomen und Polymeren erfolgen. Das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) wird dabei bevorzugt genutzt, da es sehr effizient, kostengünstig und wenig zytotoxisch ist (Thomas & Klibanov 2002; Boussif *et al.* 1996; Boussif *et al.* 1995). Die große Anzahl protonierbarer Aminogruppen verleiht PEI eine positive Ladung, wodurch die DNA-Komplexierung ermöglicht wird. Diese protonierbaren Aminogruppen sorgen darüber hinaus für hohe pH-Pufferkapazitäten, wodurch die DNA vor dem Abbau im Endosomen geschützt wird und eine frühe Freilassung des DNA/PEI Komplexes aus dem Lysosomen durch den sog. „Protonenschwammeeffekt“ stattfinden kann (Godbey, Wu and Mikos, 1999).

Das in HEK293-EBNA Zellen exprimierte EBNA1 ist ein multifunktionales Protein, welches aus zwei DNA-bindenden Domänen (engl. *linking region* LR), einer transkriptionsaktivierenden Domäne und einem Kernlokalisierungssignal besteht (Längle-Rouault *et al.* 1998; Dean *et al.* 1999). Das Protein bindet spezifisch an den Replikationsursprung des EBV (EBV-oriP) und steuert somit den Kerntransport zytoplasmatischer DNA (Fischer *et al.*, 1997). In Folge der Zellteilung werden Plasmide, die den oriP enthalten über einen gewissen Zeitraum semistabil repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben (Lindner and Sugden, 2007). Die erhöhten Kopienzahlen und die längere Halbwertszeit führen zu beachtlichen Proteinausbeuten im Gramm-pro-Liter Bereich (Backliwal *et al.* 2008).

Die Zelllinie HEK293-6E, die in dieser Arbeit verwendet wurde, enthält eine gekürzte Variante des EBNA1-Gens (EBNA1t), das nachweislich stabiler und im höheren Level exprimiert wird als EBNA1 in voller Länge (Durocher, 2006). Dabei führt die Nutzung von Plasmidvektoren der pTT-Serie zu guten Transfektionsergebnissen (Durocher, Perret and Kamen, 2002). Der EBV-oriP enthält mit der „family of repeats“ (FR) und dem Element der „dyad symmetry“ (DS) zwei *cis*-agierende Komponenten die von EBNA1 transaktiviert werden (Reisman, Yates and Sugden, 1985). Mit der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne am C-terminalen Ende des Proteins, bindet es als Dimer an sein palindromisches Sequenzmotiv innerhalb des latenten EBV-Replikationsursprungs oriP (Bashaw and Yates, 2001). Das FR-Element besitzt gegenüber EBNA1 eine größere Affinität als das DS-Element (Jones, Hayward and Rawlins, 1989). Daher stellt das DS-Element den eigentlichen Replikationsursprung innerhalb des oriP dar, welcher zwei Paar nahe beieinanderliegende EBNA1-Bindestellen besitzt, während das FR-Element bei der Transaktivierung durch EBNA1 als Transkriptionsverstärker dient und mit 20 Bindestellen eine größere Bindungskapazität aufweist. Das FR-Element ist darüber hinaus essentiell für die EBNA1-vermittelte Anheftung an das Wirtszellgenom und dem

damit einhergehenden Rückhalteeffekt der Plasmide im Zellkern (Wysokenski and Yates, 1989).

Neben kostengünstigen Transfektionsreagenzien und genetisch modifizierten Zelllinien zur Transkriptionssteigerung gibt es eine Reihe von Reagenzien, welche zur Expressionssteigerung rekombinanter Proteine eingesetzt werden. So erfolgt beispielsweise 48 Stunden nach der Transfektion von HEK293-6E Zellen die Zugabe von TN1 (Tom, Bisson and Durocher, 2008), da Tryptone nachweislich zu einer Expressionssteigerung und somit zu einer erhöhten Produktausbeute beitragen (Franek, Hohenwarter and Katinger, 2000; Pham *et al.*, 2003; Pasupuleti, Holmes and Demain, 2008). Auch die Zugabe von Natriumvalproat, welche 96 Stunden nach der Transfektion erfolgt, kann die Produktausbeute erhöhen (Wulhfard *et al.*, 2010). Das Molekül inhibiert selektiv die katalytische Aktivität von Histondeacetylasen (HDAC) der Klasse 1 und induziert den proteolytischen Abbau von HDAC der Klasse 2 (Krämer *et al.*, 2003), wodurch die Histone vermehrt acetyliert vorliegen und die Transkription vereinfacht wird. Ein weiterer aus der Valproat-Supplementierung resultierender Effekt ist die Behinderung der Zellen in der Proliferation (Cinatl *et al.*, 1997).

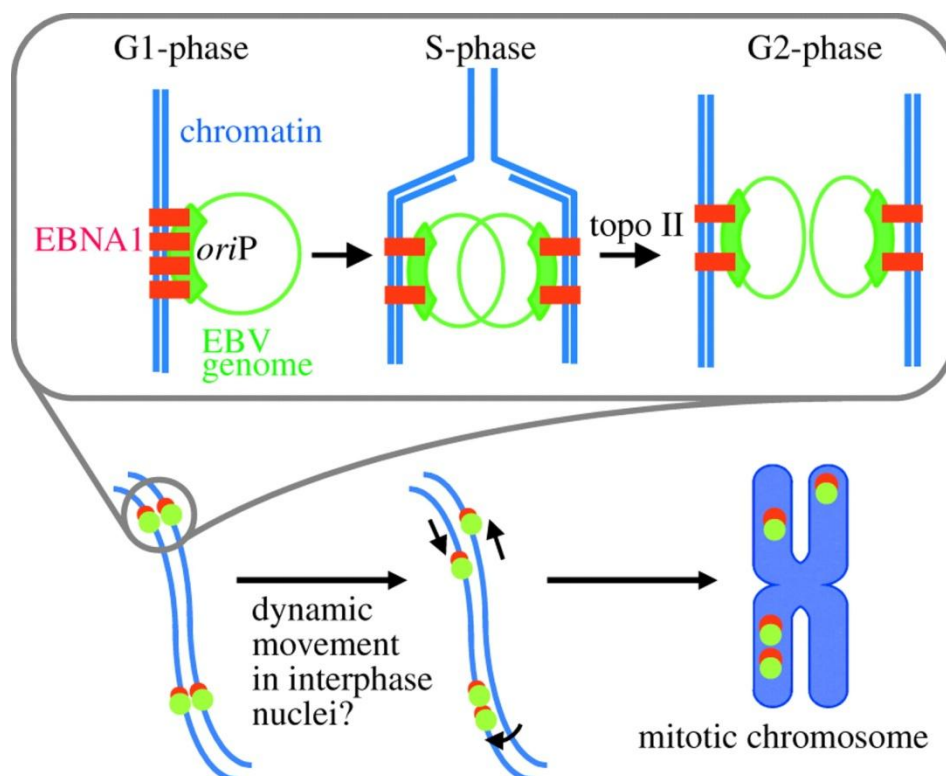


Abbildung 1-1: Übersicht über die EBNA1 vermittelte Aufteilung des EBV Episomens auf die Schwesterchromatiden. Ein Cluster aus EBNA1-Molekülen steuert die nicht-kovalente Assoziation von EBV Episomen mit dem zellulären Chromatin. In der S-Phase werden gleiche Menge an EBNA1 Molekülen an die Schwesterchromatiden verteilt, während zeitgleich die zelluläre und virale Replikation stattfindet (Yates *et al.*, 2007).

1.2.2 Stabile Proteinexpression in CHO-Zelllinien

Bei der stabilen Proteinexpression muss das gewünschte Gen (*gene of interest*) in das Wirtszellgenom integriert werden. Dadurch können rekombinante Proteine in einem kontinuierlichen Kultivierungsverfahren unbegrenzt hergestellt werden.

Die Prozesse sind unter konstanten Bedingungen reproduzier- und vorhersagbar und eignen sich ebenfalls für eine Maßstabvergrößerung im Bioreaktor bis zu einem Volumen von mehreren Tausend Litern (Xing *et al.*, 2009). Diese Art der Produktion wird vorzugsweise dann genutzt, wenn große Mengen an rekombinantem Protein gebraucht werden.

Das Arbeitspferd der rekombinanten Proteinproduktion, insbesondere der pharmazeutischen Industrie, stellen die *Chinese Hamster Ovary*- (CHO) Zellen dar, welche in den späten 1950er Jahren von Theodore Puck aus den Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*) isoliert wurden (Puck, Cieciura und Robinson, 1958). CHO-Zellen können exogene DNA sehr leicht in ihr Genom integrieren, wodurch sie sich hervorragend für die stabile Proteinexpression eignen. Darüber hinaus sind sie sehr robust und zuverlässig und zeichnen sich v.a. durch ihre beispiellose Anpassungsfähigkeit an serumfreie Kultivierungsbedingungen in Suspension und das Erreichen hoher Zelldichten aus. Darüber hinaus sind CHO-Zellen von einem regulatorischen Standpunkt aus betrachtet sehr sicher, da die meisten Humanpathogene wie HIV, Influenza, Polio oder Herpes nicht in der Lage sind, sich in CHO-Zellen zu replizieren (K. Jayapal *et al.*, 2007).

Das erste therapeutische, kommerziell vermarktete Protein aus Säugerzellen, der humane Gewebefibrinogenaktivator (tPA), wurde in CHO produziert (Kaufman *et al.*, 1985). Das weltweit erzielte Jahreseinkommen, welches mittlerweile durch die Produktion mit CHO erzielt wird, übersteigt bereits 100 Milliarden US \$ (Jadhav *et al.*, 2013). Dabei stellen monoklonale Antikörper den größten und wichtigsten Bereich unter den weltweit hergestellten Biopharmazeutika dar (Aggarwal, 2012). Etwa 70 % aller rekombinanten biopharmazeutischen Wirkstoffe für menschliche Medikamente werden heute in immortalisierten CHO-Zellen hergestellt. Neben den genannten Vorzügen von CHO-Zellen, gibt es auch Einschränkungen in Bezug auf die Wahl des geeigneten Produktionsklons. Jeder Zellklon, welcher zur Produktion des Zielproteins verwendet wird, muss zunächst zeitaufwändig isoliert und auf zahlreiche Eigenschaften hin überprüft werden, so sind u.a. Phänotyp, Produktqualität, Klonalität, Verdopplungszeit und Langzeitstabilität unter Prozessbedingungen entscheidende Kriterien bei der Wahl des geeigneten Klons. Doch auch nach diesem Selektionsprozess kann es unter Umständen zu einer spontanen Veränderung des Phänotyps und der Kultivierungseigenschaften kommen, wodurch die Wahl der Produktionszelllinie nach wie vor eine Herausforderung darstellt (Jadhav *et al.*, 2013). Die Erhöhung der klonalen Stabilität stellt einen wichtigen Bereich der aktuellen Forschung dar, während es bereits eine Reihe bedeutsamer

Verbesserungen in Bezug auf die zu erreichende Produktmenge gibt. Beispielsweise können mittlerweile Ausbeuten im Bereich von 2 - 6 g/l in der Antikörperproduktion durch Medienoptimierung, verbesserte Fütterungsstrategien oder geeignetere Aufreinigungsverfahren erzielt werden (Wurm, 2004).

Die genomische Variabilität von CHO-Zellen und der Fakt, dass sie für viele Gene hemizygot ($2n = 22$) sind (Chasin and Urlaub, 1975) ermöglichte die Isolierung von CHO-Mutanten, denen wichtige Enzyme des Stoffwechsels fehlen. Diese Mutanten sind abhängig von der Supplementierung bestimmter Nährstoffe, wodurch sie besonders geeignet für die Herstellung von Produzentenzelllinien in Folge der Verwendung eben dieser Zusätze als Selektionsmarker sind.

Eines der meist genutzten Systeme ist das CHO/DHFR-Expressionssystem. Dabei werden speziell DHFR-defiziente CHO Zellen genutzt, welchen das Enzym Dihydrofolatreduktase fehlt, das bei der Synthese von Glycin, Purinen und Thymidin eine wichtige Rolle spielt und somit einen stringenten Selektionsmarker darstellt (Urlaub and Chasin, 1980). Zunächst erfolgt die Transfektion des gewünschten Transgens und die zufällige Integration in das Wirtszellgenom. Anschließend kommt es zur Selektion der stabil exprimierten Zellklone. Im Falle der CHO DHFR-Zellen wird die für das Enzym DHFR kodierende cDNA kotransfiziert. Die Selektion beginnt 24 h - 48 h nach der Transfektion mit GHT-Medium, das frei von Glycin, Hypoxanthin (einem Purin) und Thymidin ist. Nur Zellen die DHFR aufgenommen haben und es durch heterologe Rekombination in ihr Genom integriert haben, überleben den Selektionsprozess. Bei dieser Rekombination wird auch das Transgen in das Genom integriert. Nach der Selektion können überlebende Mischklone oder vereinzelte Klone bzw. die integrierten DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Durch die gesteigerte Zugabe von Methotrexat (MTX) - ein Folat-Analogon, wird die DHFR inhibiert. Es überleben nur die Zellen, welche entweder bereits bei der Transfektion mehr Plasmid-DNA aufgenommen hatten oder durch einen bisher ungeklärten Mechanismus die Kopienzahl an einem bestimmten Integrationsort erhöhen konnten (Kim, Kim and Lee, 1998).

Neben dem CHO/DHFR-System gibt es noch ein weiteres System, was ebenfalls auf dem Fehlen eines essentiellen Stoffwechselenzyms beruht, das Glutaminsynthase-System (GS-System) (Bebbington *et al.* 1992; Chu & Robinson 2001). Hier wird Methioninsulfoximin (MSX) als GS-Inhibitor eingesetzt um die Selektionsstringenz zu erhöhen (Cockett, Bebbington and Yarranton, 1990).

Die meist genutzte Selektionsmethode ohne die Notwendigkeit einer defizienten CHO-Zelllinie ist das Einbringen des Transgens und eines Selektionsmarkers auf einem gemeinsamen Plasmid. Durch die Selektion mit einem Antibiotikum überleben nur die Zellen, welche sich durch Aufnahme der Plasmid-DNA eine Resistenz aneignen konnten. Die Integration des bakteriellen Neomycinphosphotransferasegens führt zur einer Resistenz gegenüber Geneticin (G418) (Southern and Berg, 1982). Durch die Erhöhung der Konzentration des verwendeten Antibiotikums

oder bestimmter Inhibitoren, werden bevorzugt die Zellen angereichert, welche hohe Expressionsraten oder Genkopienzahlen aufweisen (Wurm, Gwinn and Kingston, 1986). Das Vorhandensein identischer Kopien an verschiedenen Stellen im Genom kann unter Umständen zu einer Rekombination und somit zu Chromosomenfehlern führen (Derouazi *et al.*, 2004). Darüber hinaus kann es durch die Integration sich wiederholender Genkopien innerhalb eines Lokus zum Gen-Silencing (*repeat-induced gene silencing*; RIGS) kommen, was sich die Zelle u.a. bei der Abwehr von Retroviren zu Nutze macht (Garrick *et al.*, 1998; McBurney *et al.*, 2002). Das Entfernen des Selektionsdrucks im Verlauf der Kultivierung kann unter Umständen die Proteinausbeute durch den *mosaic gene silencing* Effekt verringern (Liu, Xiong and Gossen, 2006).

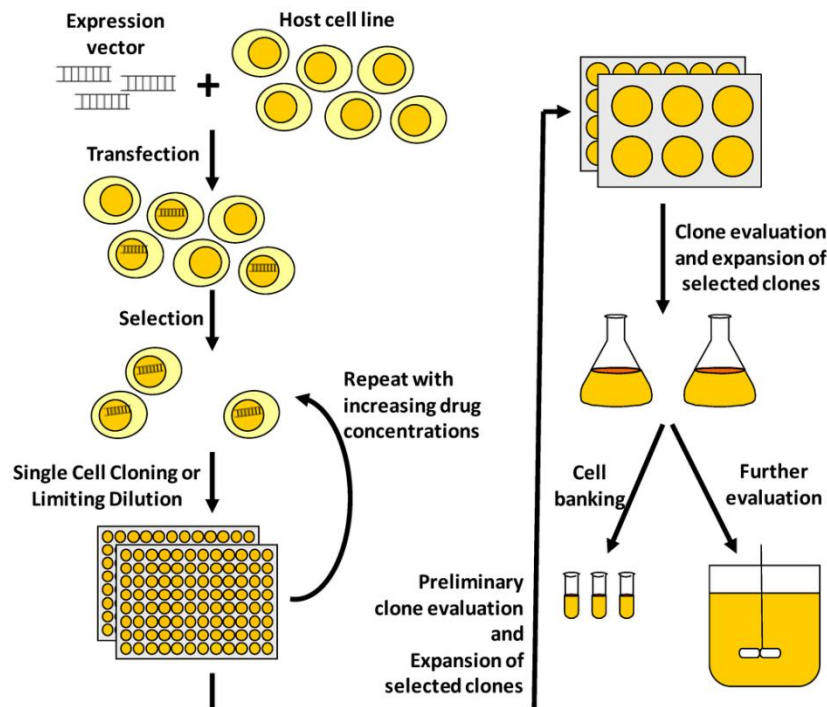


Abbildung 1-2: Schematische Übersicht über den allgemeinen Ablauf bei der Zelllinienentwicklung für die rekombinante Proteinherstellung. Nach Transfektion der Wirtszelle mit dem Expressionsvektor, welcher das GOI und einen Selektionsmarker enthält, werden die Zellen einem Selektionsdruck unterzogen und vereinzelt um die Zellen klonal zu isolieren, welche das GOI stabil exprimieren. Bei der Verwendung von Systemen, die auf Genamplifikation beruhen, wird die Konzentration des Selektionsmediums (z.B. MTX oder MSX) schrittweise erhöht um Zellklone zu erhalten, welche eine erhöhte Produktivität aufweisen. Solche Zellklone werden expandiert und in Form von Zellbänken für die Langzeitlagerung konserviert und aufbewahrt, bevor sie in weiterführenden Experimenten auf Stabilität und Produktqualität überprüft werden (Lai, Yang and Ng, 2013).

Da es sich im Allgemeinen bei der stabilen Integration eines Transgens um ein eher seltenes Ereignis handelt und sich je nach Integrationsort (Positionseffekt) und Anzahl der integrierten Genkopien unterschiedliche Expressionseigenschaften

beobachten lassen, ist eine umfangreiche Charakterisierung der isolierten Zellklone notwendig. Dabei sind in erster Linie die Klonalität, die Langzeitstabilität und die Höhe der Expression von entscheidender Bedeutung. In der Regel erfolgt die Isolation isogenetischer Klone durch serielle Verdünnung. Dies kann sehr viel Zeit und Arbeit in Anspruch nehmen und gewährleistet auch nur bedingt die Monoklonalität eines Zellkons. Um die damit anfallenden Entwicklungskosten und die Arbeitszeit zu verringern gibt es v.a. im industriellen Umfeld automatisierte Hochdurchsatzplattformen, welche sich verschiedene Technologien und Robotersysteme zu Nutze machen. Neben der automatisierten Isolation von Einzelzellen durch die Verwendung des ClonePix FL Systems (Nakamura and Omasa, 2015), kommen auch andere Verfahren zum Einsatz, wie z.B. die fluoreszenzbasierte Einzellsortierung (FACS) in Kombination mit ELISA-Messungen mit Hilfe des TECAN Freedom EVO Systems, welches zur Bestimmung der Produktivität von bis zu 10 000 Klonen eingesetzt werden kann (Shi *et al.*, 2011). Aber trotz der Isolation stabil exprimierender Einzelklone können durch Mosaizismus interklonale Veränderungen auftreten (Kaufman *et al.* 2008; Würtele *et al.* 2003; Kim *et al.* 1998). Dabei kommt es in Folge epigenetischer Modifizierungen exogener DNA zu einem *Silencing* der Transkription, da sich die Transkriptionseinheiten des Transgens zu denen der endogenen DNA unterscheiden. Kaufman *et al.* (2008) konnte sogar zeigen, dass bereits die verwendete Methode zur Isolation der stabil transfizierten Zellklone die Expressionseigenschaften beeinflussen kann. In einem direkten Vergleich konnte nachgewiesen werden, dass eine fluoreszenzbasierte Einzellsortierung der Standardselektionsmethode mit Antibiotika vorzuziehen ist, da nur dies eine Uniformität und Stabilität der Genexpression gewährleistet.

Neben der Produktion von Biopharmazeutika wird die stabile Proteinproduktion ebenfalls genutzt um schwierig zu exprimierende Targets für die Strukturbiologie in ausreichender Menge herzustellen. Da mittlerweile ein verstärktes Interesse an Glykoproteinen besteht, stellt dies Strukturbiologen vor immer anspruchsvollere Aufgaben. Komplexe N-Glykosylierungen weisen in der Regel eine starke Heterogenität auf, wodurch die Bildung von Kristallen verhindert wird. Hierbei macht man sich das Vorhandensein glykosylierungsdefizienter Säugerzellen zu Nutze. CHO Lec3.2.8.1 (Stanley, 1989) exprimieren N-glykosylierte Proteine des *high-mannose* Typs ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$), welcher bis auf ein endständiges N-Acetylglucosamin (GlcNAc) durch den Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H) verkürzt werden kann. Dadurch erhalten die Glykoproteine eine höhere Homogenität und zeigen ein erhöhtes Kristallisationspotential (Davis *et al.*, 1993). Unter Verwendung der CHO Lec3.2.8.1 konnten bereits eine Reihe von Proteinstrukturen aufgeklärt werden (Büssow, 2015).

1.3 Zelllinienentwicklung durch die “Tag- und Targeting-Strategie”

Der herkömmliche Weg zur Herstellung einer rekombinanten Zelllinie verläuft nach einem etablierten Schema: Der Transfektion des rekombinanten Gens gemeinsam mit einem Selektionsmarker, welcher der Zelle einen Überlebensvorteil nach erfolgreicher Integration bietet. Durch die Zugabe des selektiven Agens einige Tage nach der Transduktion, überleben nur solche Zellen, die das Selektionsgen exprimieren. Anschließend erfolgt durch aufwändige Screeningprozesse und klonale Vereinzelung die Isolation stabil exprimierender Produzentenzellen. Dieser Prozess ist sehr arbeitsaufwändig und kann bis zu 12 Monate in Anspruch nehmen (Lai, Yang and Ng, 2013). Für jedes neu zu produzierende rekombinante Protein muss dieser Prozess immer wieder von Beginn an durchlaufen werden. Durch die zufällige Integration des Transgens, kann keine Reproduzierbarkeit gewährleistet werden.

Daher gibt es eine Reihe von Alternativen um die Zeit und die Kosten für die Generierung von stabilen Zelllinien zu minimieren. Einen Vorteil bietet das sequenzspezifische Rekombinationssystem, welches normalerweise in Bakterien, Bakteriophagen oder Hefen vorkommt. Hierbei werden heterologe Rekombinasen genutzt um eine Exzision, Insertion oder Inversion von DNA Fragmenten innerhalb bestimmter Sequenzen im Genom zu induzieren. Es wurde ursprünglich entwickelt um die Genfunktion sowie die Regulations- und Expressionseigenschaften bestimmter Loci zu studieren (Branda and Dymecki, 2004).

Zu den bekanntesten und am häufigsten verwendeten sequenzspezifischen Rekombinationssystemen zählen das Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 (Sauer and Henderson, 1988), das Flp/FRT-System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (O’Gorman, Fox and Wahl, 1991) und das Φ C31 Integrase-System aus *Streptomyces lividans* (Groth *et al.*, 2000). Bei den Enzymen Cre (*causes recombination*) und Flp (Flippase) handelt es sich um Tyrosin-Rekombinasen, wohingegen Φ C31 eine Serin-Rekombinase ist. Die Katalyse verläuft über eine kovalente Zwischenstufe, in der ein spezifischer Aminosäurerest der Rekombinase (z.B. Tyrosin im Fall der Tyrosin-Rekombinase) über nukleophilen Angriff eine Phosphatesterbindung mit der Ziel-DNA-Sequenz ausbildet, die beide beteiligten homologen DNA-Strände gegeneinander austauscht und das DNA-Rückrat religiert. Während es bei der Tyr-Rekombinase zur Ausbildung einer *Holiday Junction* (HJ) kommt, veranlassen Ser-Rekombinasen während der Rekombination eine 180° Rotation der Ziel-DNA.

Als Voraussetzung zur Nutzung dieser Systeme für die Generierung von stabilen Produzentenzelllinien ist das Einbringen der spezifischen Rekombinase-Erkennungssequenzen (RT; *recombinase target sites*) in das Wirtszellgenom. Dieser Schritt wird auch als “*Tagging*” bezeichnet. Jede Rekombinase erkennt nur das für sie spezifische Sequenzmotiv. Im Fall der Cre-Rekombinase handelt es sich dabei um die 34 bp loxP-Sequenz, bei der Flippase um die 48 bp FRT-Sequenz und bei Φ C31 die beiden heterospezifischen Sequenzen attB (34 bp) und attP (39 bp). Die beschriebenen

Systeme bieten einen wesentlichen Vorteil gegenüber der herkömmlichen Methode: Die einmal markierte, isolierte und charakterisierte Zelllinie (Masterzelle) dient als Ausgangspunkt zur Generierung jeder beliebigen Produzentenzelllinie in Folge der zielgerichteten Integration („*Targeting*“) des gewünschten Genkonstrukts. Die Zeit bis zur fertigen Produzentenzelllinie kann damit auf 2 - 3 Monate verkürzt werden. Die Φ C31-Integrase steuert die Rekombination zweier verschiedener RTs, der sog. *attachment sites*, attP und attB, welche sich im Wirtszellgenom und im Donorplasmid befinden, welcher außerdem das Zielgen trägt. Durch die Rekombination werden spezifische Teile des Plasmids in das Genom integriert und die RT-Sequenzen werden zu den flankierenden Sequenzen attL und attR. Es handelt sich dabei um einen irreversiblen und somit unidirektionalen Prozess (Thyagarajan *et al.*, 2001). Für die Zelllinienentwicklung bietet Invitrogen eine kommerziell erhältliche Version dieser Methode an, welche als Jump-In™ bezeichnet wird. Das Vorhandensein von pseudo-Integrationsbereichen innerhalb des Genoms von Säugerzellen kann jedoch unerwartete Integrationen zur Folge haben, was wiederum eine genomische Instabilität bedeutet (Thyagarajan and Calos, 2005). Die beiden Tyr-Rekombinasen Cre und FLP katalysieren die Rekombination zwischen identischen Sequenzmotiven basierend auf einem doppelreziproken Crossover. Beide Sequenzmotive (FRT, loxP) enthalten einen 8 bp großen asymmetrischen Spacer (siehe Abbildung 1-3), flankiert durch zwei 13 bp lange invertierte palindromische Sequenzen (*inverted repeats*), an welche die dazugehörige Rekombinase binden kann (Abremski, Hoess and Sternberg, 1983; Senecoff and Cox, 1986). Die Spacerregion ist verantwortlich für die DNA-DNA Basenpaarung und bestimmt die Orientierung der RT (Andrews *et al.*, 1985).

A Cre Rekombinase Erkennungssequenzen (loxP)



B Rekombinase Erkennungssequenzen (FRT)



Abbildung 1-3: Cre und FLP Erkennungssequenzen. A: Die Cre-Rekombinase Erkennungssequenz *loxP* (von engl. *locus of X-over P1*) entstammt dem Bakteriophagen P1 und besteht aus 34 Basenpaaren, einschließlich einer asymmetrischen Sequenz von 8 Basenpaaren (Spacer; blauer Pfeil), die beidseitig von palindromischen 13 bp langen Sequenzen flankiert ist.

B: Die FLP-Rekombinase Erkennungssequenz FRT besteht ebenfalls aus einer asymmetrischen Spacer-Sequenz (blau), welche durch drei 13 bp *inverted repeats* flankiert ist und die Bindungsstellen der FLP Rekombinase darstellen. (weiße Pfeile). Nur die beiden flankierenden Sequenzen in direkter Nachbarschaft zu der Spacer-Region sind für die FLP-Rekombinaseaktivität essentiell.

Cre und FLP können sowohl eine Exzision, Insertion oder Translokation von DNA-Sequenzen bewirken (siehe Abbildung 1-4). Dabei bedingt die Orientierung der beiden Erkennungssequenzen die Art der Rekombination (Branda and Dymecki, 2004). Wenn die beiden RT-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert sind, wird die entsprechende DNA-Sequenz herausgeschnitten (Exzision). Die beiden verbleibenden RT-Enden werden zusammengefügt und es kommt zum Abbau des entstehenden kurzen ringförmigen DNA-Abschnitts. Sind die beiden RT-Sequenzen auf der DNA in entgegengesetzter Richtung orientiert, katalysiert das Enzym die Inversion (d. h. das Vertauschen der beiden Enden); der flankierte DNA-Abschnitt wird um 180° gedreht. Die monomolekulare Exzision findet dabei gegenüber der bimolekularen Insertion bevorzugt statt (Baer and Bode, 2001). Wenn die flankierenden RT-Sequenzen invers orientiert sind, katalysieren FLP und Cre die Inversion einer DNA-Sequenz bis zum Erreichen eines thermodynamischen Gleichgewichts. Die Translokation zweier distaler Sequenzen findet statt, wenn einzelne RT-Sequenzen auf zwei linearen DNA-Molekülen miteinander rekombinieren.

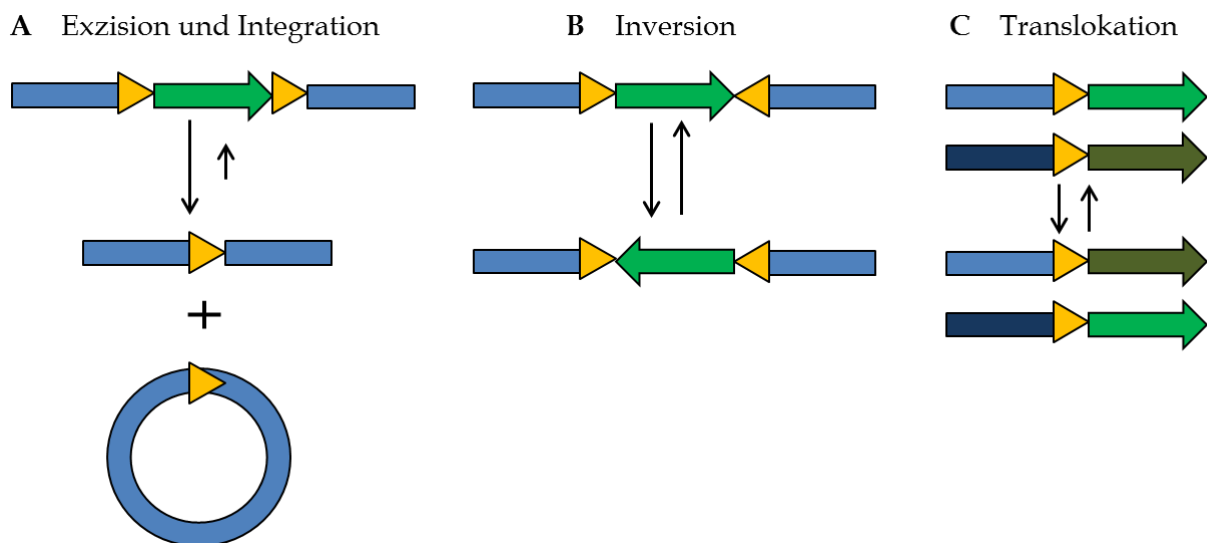


Abbildung 1-4: Arten der Rekombination. Die räumliche Orientierung der Rekombinase-Erkennungssequenzen (gelbe Dreiecke) bestimmt das Rekombinationsereignis: Bei gleicher Orientierung der FLP bzw. Cre-Erkennungssequenzen kommt es zur Exzision eines zirkulären Moleküls oder zu einer Integration eines zirkulären Moleküls in ein lineares Molekül, wenn beide Moleküle jeweils eine identisch orientierte Erkennungssequenz tragen (A). Sind die Erkennungssequenzen eines flankierten DNA-Fragments entgegengesetzt orientiert, findet eine Inversion statt (B). Eine Translokation von DNA-Fragmenten findet statt, wenn jeweils eine identische RT-Sequenz auf einem linearen Molekül vorliegt (C).

Bei der Verwendung von Rekombinasen zur stabilen Integration von Transgenen in das Wirtszellgenom ist ein stringentes Selektionssystem erforderlich, da eine Geninsertion aus thermodynamischer Sicht nicht bevorzugt stattfindet. Ein ATG-defizientes Antibiotikaresistenzgen wird in Folge der gerichteten Integration komplementiert, wodurch die Zelle nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums einen entscheidenden Selektionsvorteil erhält. Der Donorvektor, welcher das GOI trägt, enthält darüber hinaus einen weiteren Promotor und das fehlende Start-Codon um das Selektionsgen nach erfolgreicher Integration zu aktivieren. Gleichzeitig dient die Ausbildung der Resistenz als Nachweis für korrekt ausgetauschte Tochterzellen (O’Gorman, Fox and Wahl, 1991).

Invitrogen nutzt diese Methode in seinem Flp-In™ System. Dieses System basiert auf einer Flp-gesteuerte Integrationsstrategie. Hierfür werden zunächst Wirtszellen durch die stabile Integration einer Kopie eines Tagging-Vektors generiert, welcher neben einem Fusionsgen aus LacZ und einem Zeocin-Resistenzgen, eine einzelne FRT-Erkennungssequenz enthält. Durch die Kotransfektion eines Flp exprimierenden Vektors und dem Flp-In™ Vektor, welcher dieselbe FRT-Sequenz beinhaltet und das GOI trägt, kommt es zu einer sequenzspezifischen Rekombination. Da eine Insertionsreaktion thermodynamischen und kinetischen Barrieren unterliegt, erfolgt anschließend ein stringentes Selektionsverfahren (O’Gorman, Fox and Wahl, 1991; Schübeler, Maass and Bode, 1998; Francastel *et al.*, 1999; Bode *et al.*, 2000). Das Flp-In™ System verwendet als “Selektionsfalle” ein nicht-funktionales ATG-defizientes Hygromycin-Resistenzgen. Nach korrekter Integration des Flp-In™ Vektors in den markierten Lokus, wird das Resistenzgen komplementiert und infolge dessen aktiviert. Die rekombinanten Tochterzellen werden gegenüber Hygromycin resistent und verlieren ihre lacZ-Expression und die Resistenz gegenüber Zeocin. Bei dem Flp-In™-System wird neben der eigentlichen Expressionskassette zusätzlich das Plasmidrückrat, welches u.a. bakterielle DNA-Sequenzen enthält, in das Genom der Zelle integriert. Dadurch kann es zu einer Beeinträchtigung der Transgenexpression in Folge eines epigenetischen Gen-Silencing kommen (Liu *et al.* 2006; Gill *et al.* 2009). Da das GOI nach erfolgreicher Flp-In™ Reaktion durch zwei unidirektionale homospezifische FRT-Sequenzen flankiert ist, kann es bei anhaltender Rekombinase-Aktivität z.B. durch zufällige Integration in das Genom, zu einer erneuten Gen-exzision kommen (Oumard *et al.*, 2006; Turan *et al.*, 2011).

Diese Schwierigkeiten führten zu der Etablierung einer weiterführenden und effizienteren Strategie: dem Rekombinase gesteuerten Kassettenaustausch (kurz RMCE; *recombinase mediated cassette exchange*), welcher erstmals 1994 von Schlake und Bode (Schlake and Bode, 1994) vorgestellt wurde.

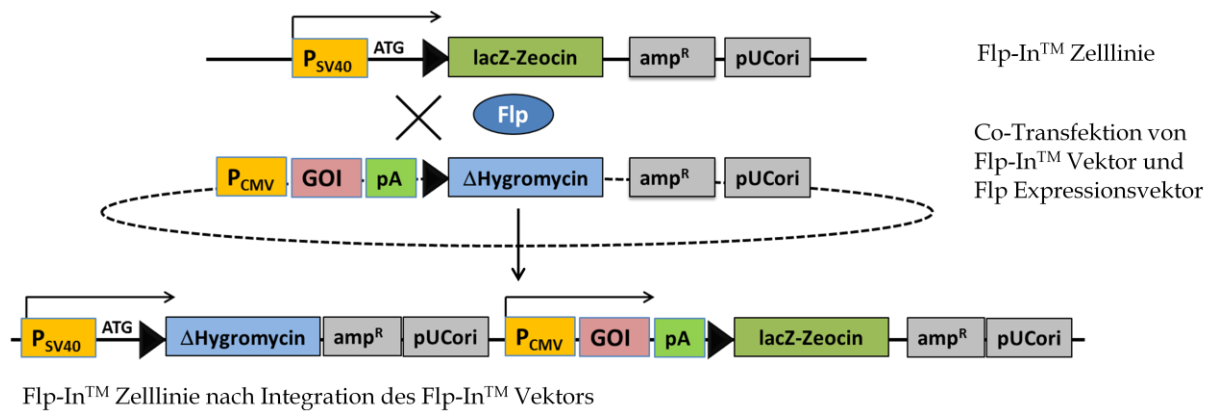


Abbildung 1-5: Das Flp-In™ System. Bei dem Flp-In™ System von Invitrogen werden Zellen zunächst in einem genetischen “Hot Spot” mit einer Expressionskassette markiert, welche einen SV40-Promotor, ein ATG-Startcodon, eine FRT-Sequenz (schwarzes Dreieck) und ein lacZ-Zeocin-Fusionsgen trägt. Nach Kotretransfektion des Flp-In™ Donorvektors und eines Helferplasmids, welcher die Expression der Flp-Rekombinase steuert, wird die Integration des Donorvektors initiiert. Alle Zellen, in denen das GOI erfolgreich durch die Flippase katalysierte Insertionsreaktion integriert werden konnte, werden in Folge der Komplementation resistent gegenüber Hygromycin.

1.3.1 Der Rekombinase gesteuerte Kassettenaustausch (RMCE)

Der Rekombinase gesteuerte Kassettenaustausch wurde sowohl für Cre/loxP als auch für Flp/FRT Systeme beschrieben. Aufgrund der Temperaturinstabilität der Flippase bei 37 °C wurde Cre eine lange Zeit als das bessere System angesehen (Buchholz *et al.*, 1996). Die Entwicklung einer Flp-Mutante, welche auch bei 37 °C aktiv ist, die Flpe (*enhanced* (Temperatur-adaptiert) Version von Flp), wies jedoch bereits eine 4x höhere Rekombinationseffizienz (Buchholz, Angrand and Stewart, 1998) und eine erhöhte Aktivität in *in vitro* RMCE Versuchen auf (Takata *et al.*, 2011). Durch eine *de novo* Synthese der Maus Codon-optimierten FlpO (*Codon optimised* Flp) Variante konnten vergleichbare Austauschereffizienzen wie in Cre-Reaktionen erzielt werden (Raymond and Soriano, 2007). Flp-gesteuerte Rekombinationen werden gegenüber Cre/loxP-Systemen bevorzugt verwendet, da v.a. in Säugerzellen pseudo-loxP-Sequenzen vorhanden sind (Thyagarajan *et al.*, 2000).

Der RMCE stellt ein verbessertes System für die Zelllinienentwicklung dar, da er die Nachteile des Flp-In™ Systems umgeht, aber dennoch in der Lage ist gezielt DNA in markierte Genombereiche zu integrieren. Durch Mutationen der Spacerregion wurden FRT-Sequenzen generiert, die ebenfalls von der Flp-Rekombinase erkannt werden, jedoch nicht mehr in der Lage sind mit der Wildtyp FRT-Sequenz bzw. anderen mutierten FRT-Sequenzen zu rekombinieren (Belteki *et al.*, 2003; Turan *et al.*, 2010), wodurch der Austausch von genetischen Material und nicht mehr die Exzision bevorzugt wird. Zwischen gleichspezifischen FRT-Mutanten ist die Rekombination jedoch weiterhin möglich und ähnlich effizient wie zwischen Wildtyp FRT-Sequenzen (Schlake und Bode, 1994).

Das RMCE System verläuft ähnlich wie andere Flp-Rekombinationssysteme in zwei Schritten ab (siehe Abbildung 1-6). Zuerst werden infolge der Transfektion und Genomintegration einer austauschbaren Genkassette Zellen selektioniert, die das Transgen stabil und in ausreichender Menge exprimieren. Dies kann entweder klassisch durch Antibiotikaselektion oder durch präparatives FACS mit einem fluoreszierenden Markerprotein erreicht werden (Nehlsen *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2009). Im zweiten Schritt wird der Reporter gegen das Zielgen (GOI) durch gerichteten Kassettenaustausch ersetzt. Hierfür müssen beide Genkassetten mit denselben heterospezifischen FRT-Sequenzen flankiert sein (z.B. FRT_{WT} und FRT₃). Die markierten Zellen werden mit dem Targeting-Vektor, welcher das GOI trägt und dem Flp-kodierenden Vektor kotransfiziert. Die transient exprimierte Flippase katalysiert den doppelreziproken Crossover der kompatiblen FRT-Erkennungssequenzen, wodurch es zum Austausch des Reportergens und der Expressionskassette des Targeting-Vektors kommt. Da es sich bei dem RMCE um ein hoch sequenzspezifisches Ereignis handelt, entfallen aufwändige Screeningverfahren nach stabil exprimierenden Tochterzellen, da alle Expressionseigenschaften der Masterzelle nach dem Kassettenaustausch in den resultierenden Tochterzellen erhalten bleiben (Bode *et al.*, 2000; Baer and Bode, 2001; Oumard *et al.*, 2006). Die Subklone zeichnen sich demnach durch ihre Isogenität aus, wodurch uniforme Expressionslevel geschaffen werden. Daher ist eine Vorhersagbarkeit der Expressionseigenschaften eines beliebigen Transgens auf Grundlage dieses Verfahrens möglich. Der RMCE führt zu 100 % positiven Rekombinationsereignissen in den selektierten Subklonen (Verhoeyen *et al.* 2001; Schucht *et al.* 2006). Aufgrund der Isogenität, können die selektierten Klone zu einem Pool zusammengefasst werden, wodurch die Zeit, eine stabile Zelllinie zu generieren, von 4 auf 2 Wochen verkürzt werden kann (Schucht *et al.*, 2006). Außerdem findet keine Integration bakterieller Vektorsequenzen in das Genom der Wirtszelle statt, was normalerweise eine Limitierung der Genexpression in Säugerzellen bedeuten kann.

Durch stringente Selektionsverfahren kann die Austauscheffizienz erhöht und eine zufällige Genomintegration verhindert bzw. minimiert werden. Eine mögliche Strategie ist die Verwendung einer Selektionsfalle. Hierfür wird ein inaktives Neomycinphosphotransferasegen (Δ neoR), welchem das ATG-Startcodon fehlt, direkt hinter die FRT-Kassette kloniert. Durch gerichtete Rekombination, wird das Δ neoR-Gen durch das Einbringen eines auf dem Targeting-Vektor befindlichen Promoters und eines ATG-Startcodons komplementiert. Durch Selektion mit G418 werden nur die positiv ausgetauschten Zellen vermehrt (Verhoeyen, Hauser and Wirth, 2001). Alternativ können durch das Einbringen eines negativen Selektionsmarkers in den ursprünglichen Tagging-Vektor, z.B. der Thymidinkinase, durch Selektion mit Ganciclovir alle nicht ausgetauschten Zellen eliminiert werden (Wong *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2006).

Neben der Selektionsfalle gibt es auch die sog. Promotorfalle, welche ebenfalls die Austauscheffizienz des RMCE erhöhen soll. Hierbei enthält der Taggingvektor einen aktiven Promotor außerhalb der FRT-Kassette (stromaufwärts) und der Targeting-Vektor ist promotorlos. Erst durch gerichtete Integration infolge des RMCE kommt es zu einer Expression des GOI (Cobellis *et al.*, 2005).

Das RMCE-System hat inzwischen in diversen Zellsystemen und für zahlreiche Einsatzgebiete, wie der Etablierung viraler Produzentenzellen (Coroadinha *et al.*, 2006; Schucht *et al.*, 2006) oder der Herstellung von EPO (Kim and Lee, 2008), Anwendung gefunden. Diese Technologie hat sich demnach bisher als geeignete Methode erwiesen, auf schnelle und hoch effiziente Weise stabile Zelllinien zu generieren, die ein beliebiges Zielgen stabil und in ausreichender Menge exprimieren.

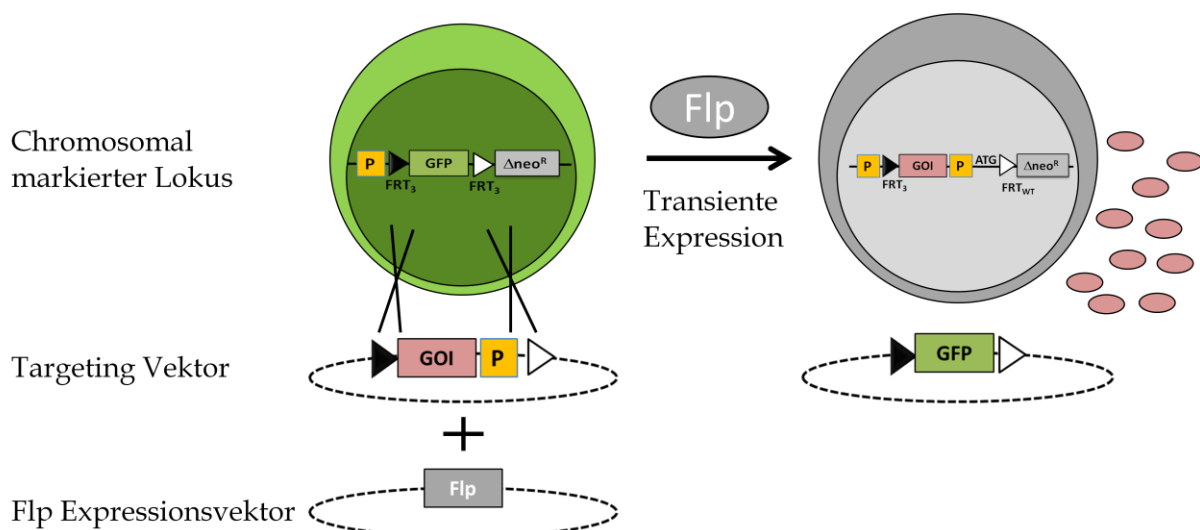


Abbildung 1-6: Der Rekombinase gesteuerte Kassettenaustausch (RMCE). Die RMCE-Masterzellen exprimieren das GFP-Markerprotein, welches durch zwei heterologe FRT-Sequenzen (FRT₃, FRT_{WT}) flankiert ist. Die Expression wird von einem Promotor (z.B. EF1 α) gesteuert, welcher sich 5'-stromaufwärts von der FRT₃-Erkennungssequenz befindet. Stromabwärts hinter der Wildtyp-FRT-Sequenz befindet sich ein Neomycinresistenzgen, dem das ATG-Startcodon sowie der zur Transkription notwendige Promotor fehlen (Aneo^R). Es erfolgt eine Kotransfektion des Targeting-Vektors und eines Flippase-Expressionsvektors, welcher das GOI trägt. Das GOI wird von denselben heterologen FRT-Erkennungssequenzen flankiert, die auch im Tagging-Vektor enthalten sind. Darüber hinaus verfügt der Targeting-Vektor über den fehlenden Promotor und das ATG-Startcodon, welches nach erfolgreichem RMCE das Neomycin-Resistenzgen komplementiert, wodurch die Zellen resistent gegenüber G418 werden.

1.3.2 „Genome Editing“ mit Hilfe sequenzspezifischer Nukleasen

Durch die Entwicklung neuer bezahlbarer Methoden zur Genomsequenzierung und der Durchführung zahlreicher Projekte im Rahmen der Genomannotation im großen Maßstab ist es Wissenschaftlern nun möglich speziesübergreifende Kenntnisse über

die „genomische Revolution“ zu gewinnen (Gaj, 2014). Informationen über das Genom eines Organismus liefern uns Einblicke darüber, wie sich die verschiedenen Lebewesen entwickelt haben, wie sie sich verändernden Umweltbedingungen anpassen oder auch über die Entstehung von Krankheiten. Ein zentrales Anliegen hierbei ist die Verfügbarkeit von effizienten und zuverlässigen Methoden zur Erforschung der Beeinflussbarkeit des Phänotyps durch den Genotyp. Die zielgerichtete Geninaktivierung durch Homologe Rekombination stellt hierbei eine wirksame Methode dar um schlüssige Informationen über die Genfunktion zu erhalten (Capecchi, 2005). Diese Methode birgt jedoch auch eine Reihe von Nachteilen wie z.B. der geringen Effizienz mit der die Insertion des Genkonstrukts in den chromosomalen Lokus stattfindet, aufwändige und zeitintensive Selektionsprozesse sowie das mögliche Entstehen nachteiliger Genommutationen. Der Knockdown durch RNA-Interferenz (RNAi) im Hochdurchsatzverfahren stellt eine schnelle und preiswerte Alternative zur Homologen Rekombination dar (McManus and Sharp, 2002). Der RNAi-Knockdown ist jedoch unvollständig, ermöglicht nur eine zeitweise Inhibierung der Genfunktion, variiert zwischen Experimenten und Laboratorien und kann zu unvorhergesehenen *off-target* Effekten führen (Gaj, 2014).

Im letzten Jahrzehnt hat sich eine weitere Methode entwickelt, welche es Forschern nun ermöglicht nahezu jedes Gen eines beliebigen Organismus zu manipulieren – das „*Genome Editing*“ oder auch Genomchirurgie genannt. Dieses Verfahren beruht auf gentechnisch veränderten Nukleasen, welche aus einer sequenzspezifischen DNA-bindenden Domäne und einer unspezifischen DNA-schneidenden Domäne bestehen (Urnov *et al.*, 2010; Carroll, 2011). Diese chimären Nukleasen ermöglichen effiziente und präzise genetische Modifikationen durch zielgerichteten DNA Doppelstrangbruch (DSB), wodurch der zelluläre DNA-Reparaturmechanismus aktiviert wird (Abbildung 1-7). Die Reparatur findet dabei auf einem von zwei in nahezu allen Zelltypen und Organismen vorkommenden Wegen statt; NHEJ (*nonhomologous end-joining*) oder HDR (*homology directed repair*). NHEJ führt dabei entweder zu einer Insertion oder Deletion von DNA-Sequenzen (Indels) unterschiedlicher Länge, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserasters eines genkodierenden Bereichs oder zu einer Mutation der Bindungsstelle trans-aktivierender Faktoren (Enhancer, Promotoren) kommen kann. HDR wird genutzt, um gezielt Punktmutationen oder Fremd-DNA durch Rekombination mit einem Donorplasmid, welcher über lokusspezifische homologe Bereiche verfügt, einzufügen. Nuklease induzierte DSBs weisen eine hohe Effizienz (bis zu 50 %) auf, wodurch die gewünschten Mutationen infolge einfacher Screeningverfahren ohne die Notwendigkeit einer Antibiotikaselektion identifiziert werden können (Sander and Joung, 2014).

Die ersten proteinbasierenden Systeme für die zielgenaue genomische Manipulation durch Nuklease induzierte DSBs stellen die Zinkfinger Nukleasen (ZFNs) und die *Transcription Activator-like Effector* Nukleasen (TALENs) dar. Aufgrund der Program-

mierbarkeit der DNA-bindenden Domäne sind diese Systeme vielseitig einsetzbar und können nahezu jede DNA-Sequenz erkennen.

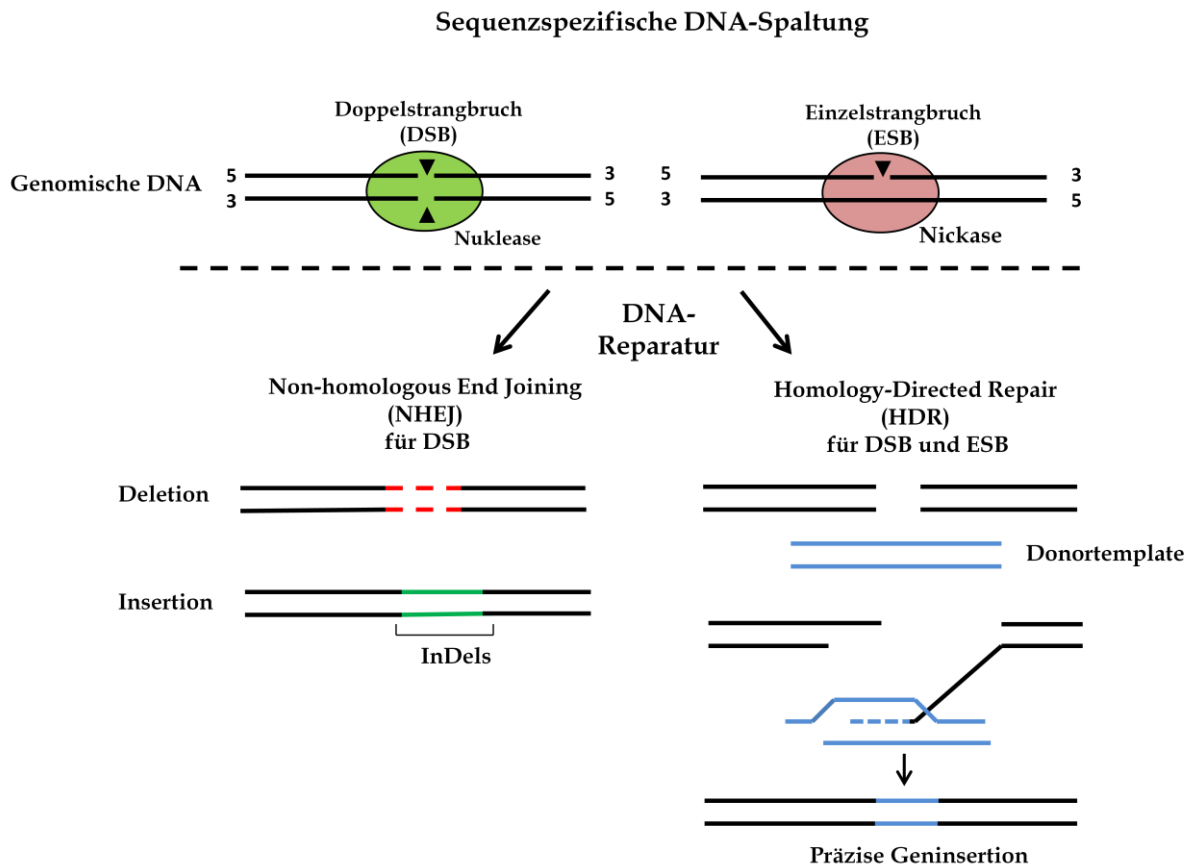


Abbildung 1-7 Reparaturmechanismen von Nuklease induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen. DNA-Doppelstrangbrüche können auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) und *Homologous Directed Repair* (HDR). NHEJ kann zu einer Insertion oder Deletion (Indels) von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge führen. HDR kann präzise Punktmutationen oder Geninsertionen bei Anwesenheit eines einzel- oder doppelsträngigen DNA Donortemplates bewirken (Abb. modifiziert nach Sander and Joung, 2014).

1.3.2.1 Zinkfinger-Nukleasen

Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) sind künstliche Fusionsproteine bestehend aus zwei miteinander fusionierten funktionalen Einheiten, einer N-terminalen Zinkfinger-domäne und einer C-terminalen DNA-Restriktionsdomäne.

Die DNA-Bindedomäne am N-Terminus wird aufgrund der koordinativen Bindung eines Zn^{2+} -Ions, welche zwischen einer α -Helix und einem anti-parallelen β -Faltblatt besteht, als Zinkfingerdomäne bezeichnet. Dabei binden die Aminosäuren 1 – 6 der α -Helix ein DNA-Triplett. In einem ZFN-Protein werden 3 – 4 dieser Domänen

hintereinander angeordnet. Um die Spezifität von Zinkfinger-Proteinen zu erhöhen, wurden durch die Entdeckung einer hochkonservierten Linkersequenz synthetische Zinkfinger-Module entwickelt, welche DNA-Sequenzen von bis zu 18 Basenpaaren erkennen konnten (Liu *et al.*, 1997). Diese Methode machte es erstmals möglich zielgenau nur eine spezifische Sequenz im Genom zu adressieren und zu manipulieren (Beerli *et al.*, 1998; Beerli, Dreier and Barbas, 2000). Durch aufwendige Permutationsexperimente konnten für alle 64 Codons (4^3) entsprechende Zinkfinger-domänen generiert werden (Segal *et al.*, 1999; Dreier *et al.*, 2001). Hierdurch konnten vorselektierte Zinkfingermodule entsprechend der in der DNA-Sequenz enthaltenen Triplets modular zusammengefügt werden (Gonzalez *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Bhakta *et al.*, 2013). Da sich die DNA-Bindeeigenschaft der einzelnen Zinkfinger-ddomänen ändern kann, sobald mehrere Domänen zusammengefügt werden, unterliegen sie aufwändigen Selektions- und Charakterisierungsprozessen. „Oligomerized Pool Engineering“ oder kurz „OPEN“ ist eine sehr präzise Methode um die Sequenzspezifität experimentell in einem „Bakterien-Zwei-Hybrid-System (B2H)“ zu testen (Maeder *et al.*, 2009).

Am C-Terminus befindet sich die DNA-Restriktionsdomäne, das FokI, ein natürlich vorkommendes DNA-Restriktionsenzym, aus *Flavobacterium okeanoikoites*. Für die Anwendung in Zinkfinger-Nukleasen wird nur die C-terminale DNA-Restriktions-domäne des FokI-Enzyms verwendet.

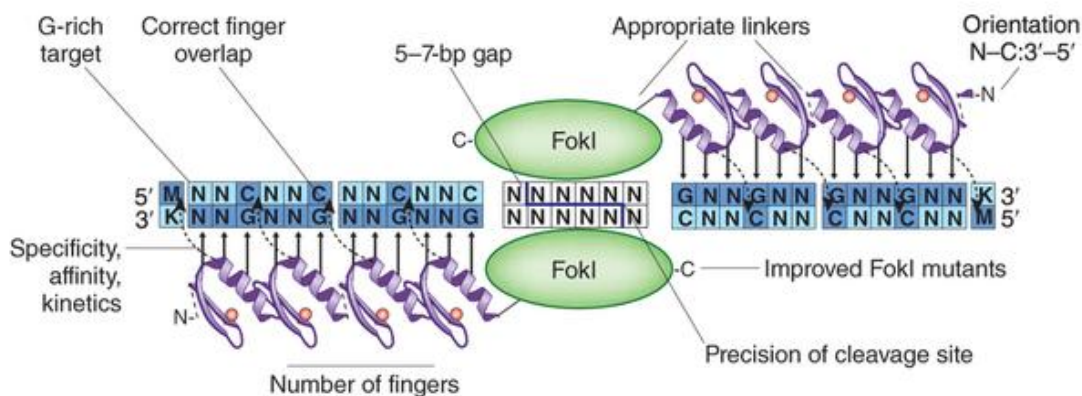


Abbildung 1-8: Zinkfinger-Nukleasen. Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) bestehen aus 3–4 gliedrigen Zinkfinger-Domänen und einer fusionierten FokI-Restriktionsdomäne. FokI kann als Dimer eine DNA-Doppelstrangbruch verursachen (Isalan, 2011).

1.3.2.2 TALENs

Die Entdeckung eines einfachen modularen DNA-Erkennungscode der TALE Proteine (*transcription activator- like effector*) (Boch *et al.*, 2009; Moscou and Bogdanove, 2009) führte zur Ausbreitung einer alternativen Plattform für die gentechnische Herstellung programmierbarer DNA-bindender Proteine. TALENs (*Transcription*

activator-like Effector Nucleases) sind, genau wie ZFNs, synthetisch hergestellte Restriktionsenzyme, die aus zwei verschiedenen funktionalen Einheiten zusammengesetzt sind, nämlich aus einer TAL-Effektor DNA-bindenden Domäne und einer Endonuklease (FokI). Die TAL-Effektor-Domäne stammt ursprünglich aus dem phytopathogenen gram-negativen Bakterium *Xanthomonas* und besitzt eine konservierte Sequenz von 33 bis 34 Aminosäuren. Die Positionen 12 und 13 sind dagegen hypervariabel (*Repeat Variable Di-residue*, RVDs) und für die Erkennung von Nukleotiden in der DNA verantwortlich (Deng *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den Zinkfingern, welche an Basentriplets binden, können die DNA-Bindedomänen der TALs jeweils ein einzelnes Nukleotid erkennen. Es gibt daher nur vier unterschiedliche Module für jedes in der DNA vorkommende Nukleotid (Boch *et al.*, 2009). Alle RVDs weisen eine Länge von 34 Aminosäuren auf, unterscheiden sich jedoch jeweils in nur zwei Aminosäuren (Abbildung 1-9). Diese zwei Aminosäuren sind verantwortlich für die Basenspezifität der jeweiligen Domäne und bedingen die Bezeichnung der jeweiligen RVDs: (HD erkennt Cytosin, NN erkennt Guanin, NG erkennt Thymin und NI erkennt Adenin). Die TAL-Effektoren aus *Xanthomonas* bestehen aus 23 RVDs, welche hintereinander angeordnet sind. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber den ZFNs ist die Möglichkeit der beliebigen Anordnung der RVDs ohne, dass es dabei zu störenden Wechselwirkungen kommt. Die einzigartige Struktur von TAL-Effektoren ermöglicht die Bindung jeder beliebigen DNA-Sequenz. Ein Nachteil der TALENs ist hingegen die Proteinelänge. Auch wenn für Deletionsexperimente die Anzahl der RVDs auf 12 - 15 verringert werden kann, weist das Protein weiterhin eine beachtliche Länge von bis zu 1000 Aminosäuren auf. Das entspricht in etwa der vierfachen Größe von ZFNs und kann z.B. in Organismen mit niedriger Expressionsrate heterologer Proteine problematisch sein. Des Weiteren entstehen auf Ebene der DNA, durch die sich wiederholenden identischen Sequenzen der RVDs, technische Schwierigkeiten beim Klonieren (Gaj, 2014). Um diese zu kompensieren, wurden spezielle Methoden entwickelt um den Zusammenbau von TALENs zu vereinfachen.

Zu diesen Strategien zählt u.a. die Klonierungstechnik "Golden Gate" (Cermak *et al.*, 2011), das Hochdurchsatzverfahren *solid-phase assembly* (Briggs *et al.*, 2012; Reyon *et al.*, 2012) und eine Ligation unabhängige Klonierungstechnik (LIC) (Schmid-Burgk *et al.*, 2012). Die einzige Limitierung für TALE-Module ist die Notwendigkeit eines T-Nukleotids am Start der TALE-Bindungsdomäne. Die Leichtigkeit mit der TALE-Module zusammengefügt werden können beweist die hohe Anzahl an vorhandenen TALENs für über 18 740 proteinkodierende Gene des Menschen (Kim *et al.*, 2013).

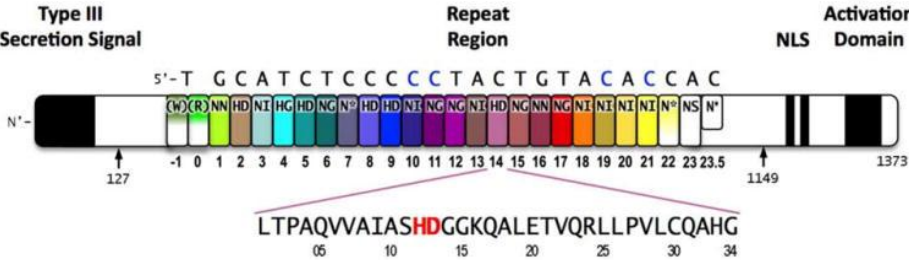


Abbildung 1-9: TAL-Effektordomäne. TAL-Effektordomänen sind modular aufgebaute Transkriptionsfaktoren. Jedes der Module (farbig) erkennt hierbei eine Base der DNA. Die Module unterscheiden sich jeweils in zwei Aminosäuren (rot) welche die Spezifität für A, T, G oder C kodieren. C-Terminal befindet sich die Aktivator-domäne, welche für die Initiation der Transkription verantwortlich ist (Mak *et al.*, 2012).

1.3.2.3 CRISPR/Cas9

Neben den sequenzspezifischen Nukleasen ZFNs und TALENs gibt es seit Kurzem eine effiziente und leicht einzusetzende Alternative, das Typ II CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas-System. Hierbei handelt es sich um ein in Bakterien und Archaeen natürlich vorkommendes adaptives Immunsystem, welches das Eindringen von Fremd-DNA (Phagen, Plasmide etc.) erkennt und mit Hilfe spezieller RNA-Moleküle und einer Endonuklease DNA schneiden kann (Horvath and Barrangou, 2010).

Das CRISPR/Cas9-System stammt aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* und besteht aus vier Genen (Cas9, Cas1, Cas2, Csn2) und zwei nicht kodierenden RNAs (tracrRNA und crRNA) (siehe Abbildung 1-10). Die crRNA besteht aus einem Cluster von repetitiven Sequenzen, welche von nicht-repetitiven Sequenzen unterbrochen werden (Protospacer). Bei diesen sich nicht-wiederholenden DNA-Sequenzen handelt es sich um Bruchstücke exogener DNA. Die pre-crRNA wird als ein Transkript synthetisiert und dann zu kleineren crRNAs (CRISPR-RNA) prozessiert, welche eine spezifische Länge von 23 Basenpaaren aufweisen (Abbildung 1-11). Die zweite nicht kodierende RNA ist die tracrRNA (*trans-activating* CRISPR-RNA), welche in der Lage ist eine Sekundärstruktur auszubilden, die der Endonuklease Cas9 eine spezifische Bindung mit der tracrRNA ermöglicht. Bevor Cas9 jedoch zu der Zielsequenz rekrutiert werden kann, bilden die beiden RNAs durch Hybridisierung eine Duplex-RNA. Durch komplementäre Basenpaarung zwischen der reifen crRNA und der Zielsequenz der Fremd-DNA kommt es zu einer Interaktion, wodurch ein Cas9-induzierter DNA-Doppelstrangbruch stattfindet. Cas9 wird jedoch nur dann aktiv, wenn die Zielsequenz die korrekte PAM-Sequenz (Protospacer Adjacent Motif) aufweist: 5'-N20-NGG (Jinek *et al.*, 2012). Cas9 schneidet 3 Basenpaare stromaufwärts von der PAM-Sequenz, wobei das Protein aus zwei funktionalen Domänen besteht,

RuvC und HNH, welche jeweils nur einen DNA-Strand schneiden können (Cong *et al.*, 2013).

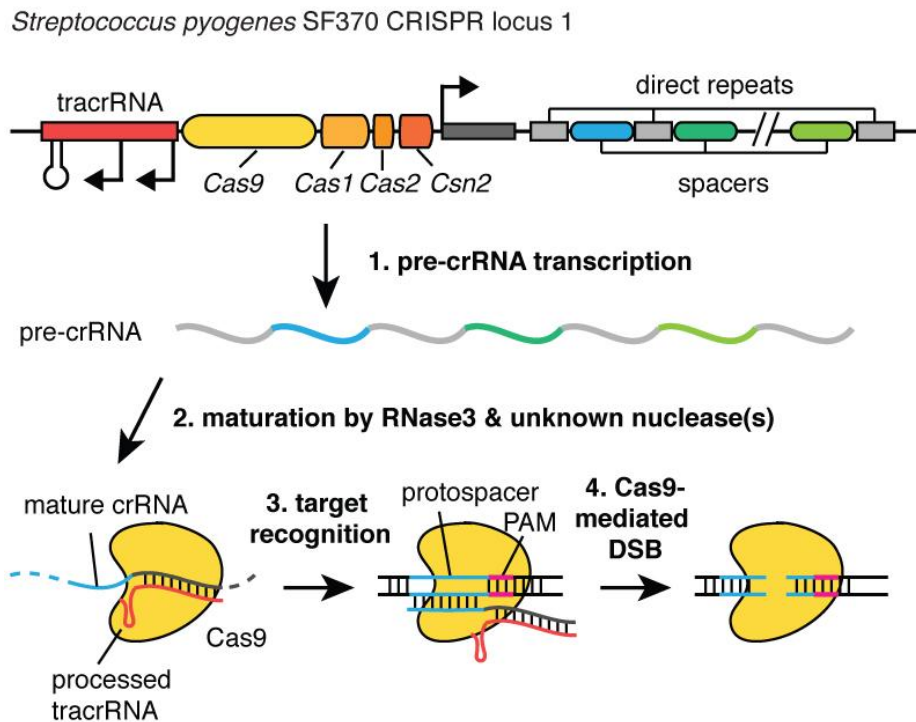


Abbildung 1-10: Schematische Übersicht über das Typ-II-CRISPR-Cas9 System (Cong *et al.*, 2013). Der Typ II CRISPR-Lokus von *Streptococcus pyogenes* SF370 enthält ein Cluster aus vier Genen, *Cas9*, *Cas1*, *Cas2* und *Csn1*, sowie zwei nicht-kodierende RNA-Elemente, die tracrRNA und eine charakteristische Anordnung sich wiederholender Sequenzen (*direct repeats*), welche durch kurze sich nicht-wiederholende Sequenzabschnitte unterbrochen werden (Spacer, jede 30 bp lang). Jedes Spacer-Element entspricht einer Fremd-DNA-Sequenz (Protospacer) und ist verantwortlich für die Spezifität der CRISPR-gesteuerten DNA-Spaltung. In der Ziel-DNA wird jeder Protospacer 3' von einer PAM-Sequenz begrenzt (*Protospacer adjacent motif*), die für jedes CRISPR-System spezifisch ist (Deveau *et al.*, 2008; Mojica *et al.*, 2009). Das Typ II CRISPR-System katalysiert den DNA-Doppelstrangbruch in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt die Transkription des pre-crRNA-Arrays und der tracrRNA vom CRISPR-Lokus. Danach erfolgt die Hybridisierung der tracrRNA mit den *direct repeats* der pre-crRNA unter Formierung einer partiell doppelsträngigen Duplex-RNA und die Bindung von Cas9. Hierdurch erfolgt die Prozessierung der pre-crRNA in die reife crRNA, welche aus jeweils einer Spacer-Sequenz besteht. Die reife RNA-Duplex rekrutiert Cas9 zu der Ziel-DNA, welche die Protospacer-Sequenz und die zugehörige PAM-Sequenz enthält. Cas9 katalysiert einen DNA-Doppelstrangbruch der Ziel-DNA 3 bp stromaufwärts von der PAM-Sequenz.

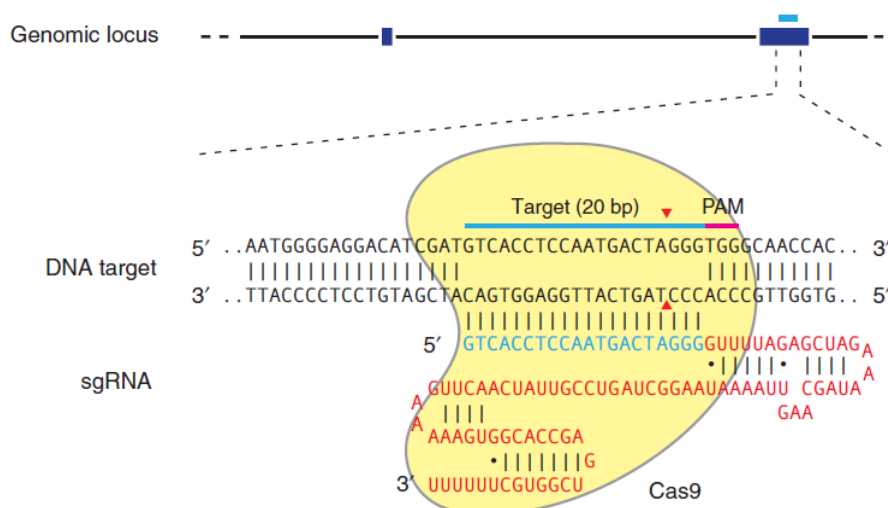


Abbildung 1-11: Die RNA-gesteuerte Cas9-Nuklease (F. Ran *et al.*, 2013). Die Cas9-Nuklease von *S. pyogenes* (gelb) wird zu der Ziel-DNA im Wirtszellgenom (Protospacer) (z.B. der menschliche EMX1-Lokus) durch eine sgRNA (*single guide RNA*) geleitet, welche aus einer 20 bp langen guide Sequenz (blau) und einem Gerüst (rot) besteht. Die guide Sequenz bindet über komplementäre Basenpaarung an die DNA-Zielsequenz (blauer Balken über dem oberen DNA-Strang) direkt 5'-stromaufwärts neben der PAM-Sequenz (5'-NGG) (pink). Cas9 steuert einen DSB ~3 bp stromaufwärts von der PAM-Sequenz (rotes Dreieck).

Durch das Einfügen einer einzigen Punktmutation kann die Aktivität dieser Domänen ausgeschaltet werden. Die Cas9 D10A Mutante besitzt eine inaktive RuvC-Domäne (RuvC⁻) und eine aktive HNH-Domäne (HNH⁺), wohingegen die Cas9 H840A Mutante über eine inaktive HNH-Domäne (HNH⁻) und eine aktive RuvC-Domäne (RuvC⁺) verfügt. Wenn nur eine Domäne aktiv ist, katalysiert Cas9 lediglich einen Einzelstrangbruch und wird dann als Nickase bezeichnet. Die Verwendung dieser Cas9-Mutanten für die zielgerichtete Genmutation verringert nachweislich die *off-target* Aktivität und wird deshalb auch bevorzugt eingesetzt (Shen *et al.*, 2014). Sind beide Domänen inaktiv (RuvC⁻ und HNH⁻) besitzt Cas9 keine Nukleaseaktivität mehr (katalytisch inaktiv), ist aber dennoch weiterhin in der Lage DNA infolge der crRNA-Spezifität zu binden. Durch die Fusion mit Effektormolekülen wie Transkriptionsaktivatoren, Repressoren oder Fluoreszenzproteinen kann katalytisch inaktives Cas9 für die zielgerichtete Manipulation bestimmter Gensequenzen eingesetzt werden (Singh, Braddick and Dhar, 2017).

Die Anwendung dieses Systems für eine gezielte Deletion von Genen hat einen entscheidenden Vorteil gegenüber der ZFN- und TALEN-Technologie: Es ist nicht nötig für eine Zielsequenz ein neues Protein zu generieren. Lediglich der Protospacer muss komplementär zur Zielsequenz gewählt werden.

Da es sich ursprünglich um ein prokaryotisches System handelt, wurden für eine erfolgreiche Übertragung auf eukaryotische Systeme einige Eigenschaften der CRISPR/Cas9-Technologie modifiziert. Für eine DNA-Bindung muss Cas9 in den Zellkern transportiert werden können. Dafür wurde eine Kernlokalisationssequenz

(NLS; engl. „*Nuclear Localaization Signal*“) angefügt. In Zellkultursystemen konnte durch das Anfügen einer N- sowie einer C-terminalen NLS eine bessere Kernlokalisation erzielt werden als durch die Verwendung einer einzelnen NLS. Für eine optimale Expression in Eukaryoten, wurde *S. pyogenes Cas9* (*SpCas9*) außerdem codonoptimiert (Cong *et al.*, 2013).

Für die Transkription von tracrRNA und crRNA musste ein spezieller Promotor gefunden werden, da eukaryotische Promotoren normalerweise von der RNA-Polymerase II erkannt und durch das Anfügen einer 5'CAP und 3'Poly-A-Sequenz modifiziert werden, was wiederum das Ausschleusen der RNA aus dem Zellkern zur Folge hat (Hocine, Singer and Grunwald, 2010). Für die Transkription der tracrRNA und crRNA in Eukaryoten wird daher der RNA-Polymerase-III-Promotor der U6 snRNA (*small nuclear RNA*) verwendet, welche am Splicing im Zellkern beteiligt ist. Der U6-Promotor wird nicht durch die RNA-Polymerase-III modifiziert und die transkribierte RNA verbleibt im Zellkern. Der U6-Promotor ist der einzige Polymerase-III-Promotor, welcher alle für die Transkription notwendigen Sequenzmotive (PSE+TATA) 5'-stromaufwärts vom Startsignal besitzt.

Da erst die Ausbildung der Duplex-RNA aus tracrRNA und crRNA von dem Cas9-Protein erkannt wird, wurden zur Verbesserung der Hybridisierung und zur einfacheren Handhabung die beiden RNAs miteinander zu der sog. *guide RNA* (gRNA) fusioniert (Mali *et al.*, 2013). Für Deletionsexperimente werden somit nur noch die gRNA und der Cas9-kodierende Vektor benötigt. Mittlerweile gibt es auch Vektoren, die neben der gRNA ebenfalls Cas9 kodieren, wodurch nur noch ein einziger Vektor notwendig geworden ist. Für eine schnelle und einfache Quantifizierung der Cas9-Aktivität, wird das Protein entweder mit einem Antibiotikaresistenzgen oder einem Fluoreszenzprotein koexprimiert. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums oder mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die modifizierten Zellen schnell und einfach isoliert und vereinzelt werden (Ran *et al.* 2013).

Durch die Verwendung der CRISPR/Cas9-Technologie ist es nun möglich nahezu jede DNA-Sequenz gezielt zu modifizieren. Dafür muss lediglich die gRNA entsprechend der Zielsequenz entworfen werden. Durch die Einfachheit und Flexibilität des CRISPR/Cas9 Systems findet es mittlerweile nahezu in jedem Organismus und Zellsystem Anwendung, u.a. in Zebrafisch (Hwang *et al.*, 2013), , *Drosophila* (Bassett *et al.*, 2013), *C.elegans* (Dickinson and Goldstein, 2016), Maus (Wang *et al.*, 2013), Schwein (X. Wang *et al.*, 2016) und sogar in iPS-Zellen (Li *et al.*, 2016). Seit dem Einzug des CRISPR/Cas Systems in die Säugerzellkultur im Jahr 2013 (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013) wurden viele Felder der medizinischen Forschung revolutioniert. So konnte CRISPR/Cas9 bereits vielfältig im Rahmen der Gentherapie einer Reihe menschlicher Erkrankungen eingesetzt werden (Xiao-Jie *et al.* 2015; Long *et al.* 2014; Xue *et al.* 2016).

Obwohl es sich bei CRISPR/Cas9 um eine weit verbreitete, vielseitig eingesetzte „Genome Editing“-Technologie handelt und sie bereits bei der Herstellung genetisch veränderter Organismen und in der präklinischen Forschung angewendet wird, birgt sie jedoch auch einige Risiken in Bezug auf ihre Sequenzspezifität. Man geht davon aus, dass die Häufigkeit mit der sog. *off-target* Effekte auftreten bei über 50 % liegen (Zhang *et al.*, 2015). Dabei handelt es sich um Mutationen innerhalb von der eigentlichen Zielsequenz abweichenden DNA-Sequenzen. Das ist gerade für die therapeutische und klinische Anwendung besorgniserregend, da es durch diese ungewollten Mutationen möglicherweise zu einer Aktivierung von tumorinduzierenden Genen kommen kann. Es wird davon ausgegangen, dass die Cas9-Spezifität streng durch die 20 Basenpaar lange sgRNA-Sequenz und der PAM-Sequenz, welche sich 3' von der Zielsequenz im Genom befindet, kontrolliert wird. Dabei kann ein Cas9-induzierter DSB aber auch bei einem 3 - 5 Basenpaar großen Mismatch auftreten. Es gibt eine Reihe von Strategien um die Häufigkeit von *off-Target*-Effekten zu minimieren. Zunächst kann die Veränderung der Sequenz der sgRNA zu einem verringerten *off-Target* Effekt beitragen. So konnte u.a. durch die Trunkierung des 3'-Endes der sgRNA, der Verkürzung der Region komplementär zur Zielsequenz am 5'-Ende der sgRNA um bis zu 3 Nukleotide (tru-gRNA) oder durch das Hinzufügen von zwei Guanin-Nukleotiden an das 5'-Ende der sgRNA die Target-Spezifität verbessert und die unerwünschten Mutationen innerhalb von *off-Target*-Sequenzen 5000-fach verringert werden (Hocine, Singer and Grunwald, 2010; Pattanayak *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2014; S. W. Cho *et al.*, 2014). Die Verwendung einer Cas9-Nickase (z.B. die D10 Mutante) in Kombination mit zwei sgRNAs, die jeweils nur einen DNA-Einzelstrang schneiden, kann das Auftreten von *off-target* Effekten um das 50 - 1500 fache verringern (Ran *et al.* 2013). Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Online Software-Programmen, die mittels spezieller Algorithmen für die Vorhersage geeignete On-Target Sequenzen entwickelt worden sind und darüber hinaus die Häufigkeit möglicher *off-target* Bindungen ermitteln können (z.B. das CRISPR Design Tool vom Feng Zhang Labor: <http://crispr.mit.edu/>).

1.4 Die Rolle von N-Glykosylierungen für die Kristallisation

Eukaryotische Systeme werden mittlerweile immer häufiger in der Strukturbiologie verwendet, da sie in der Lage sind posttranslationale Modifikationen durchzuführen, welche für die Faltung und Funktion vieler Proteine essentiell sind. Die dabei am häufigsten vorkommenden Modifikationen sind Glykosylierungen. Es wird geschätzt, dass mehr als die Hälfte aller Proteine des Menschen, darunter viele Membranproteine glykosyliert sind (Apweiler *et al.* 1999; Gomord *et al.* 2010). Glykoproteine stellen aufgrund der Größe und Heterogenität der Oligosaccharidketten eine einzigartige Herausforderung für Strukturbiologen dar. Glykane können

dabei 1 - 80 % der absoluten Proteinmasse ausmachen (Varki and Sharon, 2009). Dabei können große Variationen bezüglich Zuckerart, Anzahl der Zuckermoleküle sowie Besetzungsgrad potentieller Glykosylierungsstellen auftreten. Die hierdurch bedingte Heterogenität kann die Kristallisation von Glykoproteinen erschweren bzw. sogar verhindern (Davis and Crispin, 2010), wodurch die Verwendung der Röntgenstrukturanalyse zur Aufklärung der Proteinstruktur unmöglich wird.

In Eukaryoten werden Glykosylierungen an die Polypeptidkette im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und im Golgi-Apparat angeheftet. Man unterscheidet dabei zwei Typen von Glykosylierungen. Bei der O-Glykosylierung werden Oligosaccharide an die Hydroxylgruppe eines Serin, Threonin oder Prolin-Rests angefügt, welche sich bevorzugt in Mucin-Domänen befinden. Bei der N-Glykosylierung erfolgt die Anknüpfung von Oligosacchariden an ein Asparagin-Rest, welcher sich innerhalb der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr befindet.

Bei der N-Glykosylierung wird zunächst ein Lipid-gebundenes Oligosaccharid durch die schrittweise Anheftung von Monosacchariden an ein Dolicholpyrophosphat erzeugt (Burda and Aeby, 1999). Diese Vorläuferstruktur (engl. *precursor*) wird anschließend durch den Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex auf einen Asparagin-Rest eines Proteins mit der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen. Die vorläufige Oligosaccharid-Struktur wird zunächst durch die α -Glucosidasen I und II deglykosyliert und anschließend durch das Anfügen eines UDP-Glucose-Moleküls mit Hilfe der Glykoproteinglucosyltransferase (UGGT) reglykosyliert. Hierdurch wird die korrekte Faltung des reifenden Proteins durch die Interaktion mit den Chaperonen des ER, wie z.B. Calnexin und Calreticulin, gewährleistet. Dieser Schritt ist in allen Eukaryoten konserviert, da er für die effiziente Proteinfaltung und Oligomerisierung verantwortlich ist (Helenius and Aeby, 2001). Wohingegen die evolutionäre Anpassung der N-Glykanprozessierung im Golgi-Apparat zur Ausbildung organismenspezifischer N-Glykanstrukturen geführt hat (Varki, 2011).

Zunächst degradieren verschiedene α -Mannosidasen die Vorläuferstruktur in Oligomannoside der Form $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oder $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Man-9, Man-5). Die N-acetylglucosaminyl-transferase I (GnT-I) transferiert anschließend einen N-acetylglucosaminylrest (GlcNAc) auf Man-5, wodurch die Synthese einer Reihe verschiedener komplexer N-Glykane initiiert wird. Bei dieser GnT-I gesteuerten Reifung der N-Glykankette erfolgt im nächsten Schritt durch das Entfernen zweier Mannosylreste und der Anheftung eines weiteren terminalen GlcNAc, die Synthese der Kernregion (engl. *Core*) der Form $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, welche in allen Säugetieren und Landpflanzen vorkommt (Lerouge *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2001; Gomord *et al.*, 2010). Diese Kernregion wird je nach Organismus durch die Aktivität unterschiedlicher Glykosyltransferasen modifiziert. Reife Proteine verlassen den sekretorischen Stoffwechselweg mit einer für jeden Organismus spezifischen N-

Glykanstruktur, welche eine Reihe von biologischen Funktionen steuern (Varki, 1993; Gagneux and Varki, 1999).

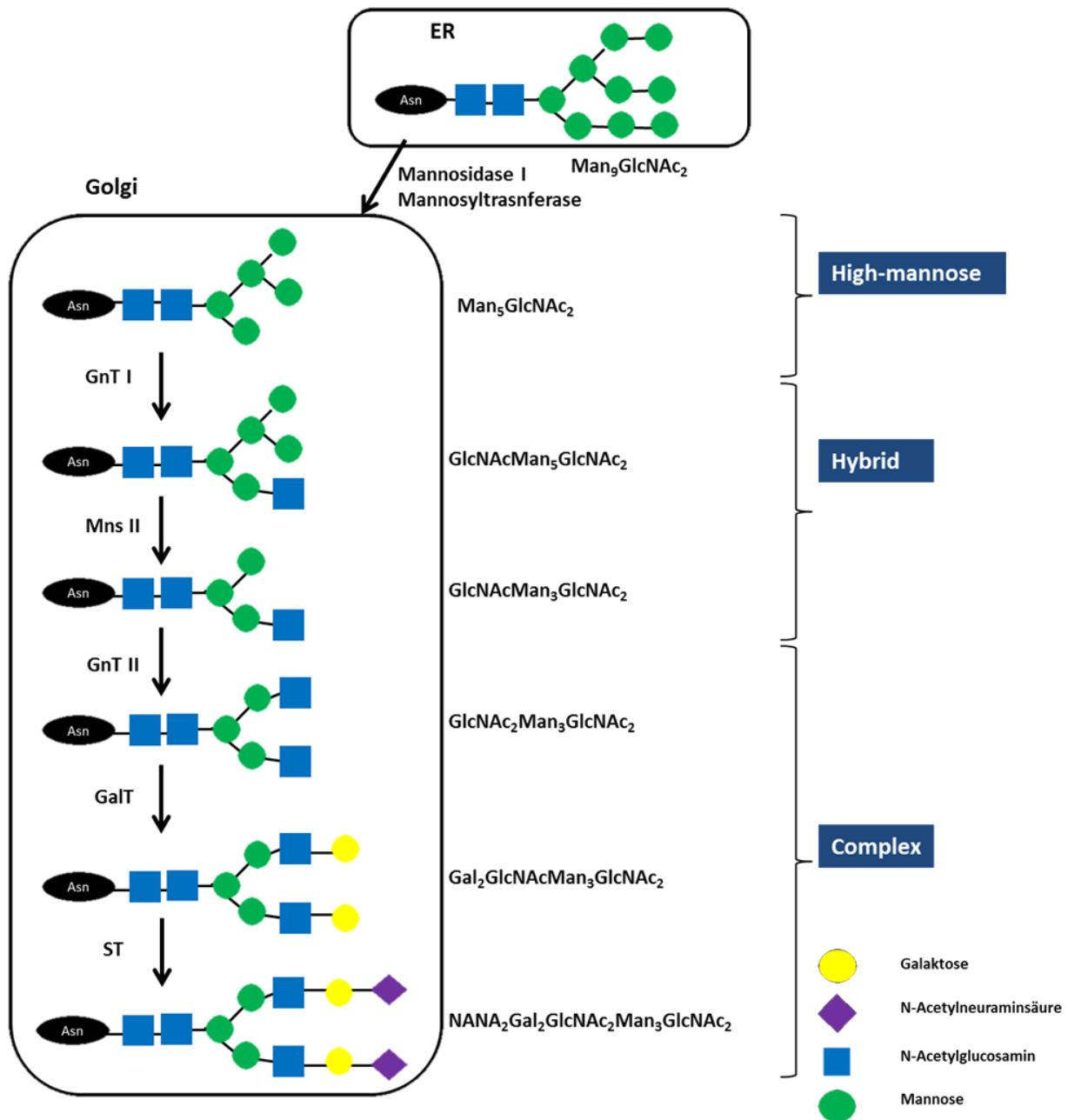


Abbildung 1-12: Übersicht über den N-Glykosylierungsstoffwechsel im Menschen (vereinfacht). Ausgangspunkt ist das $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, welches im ER gebildet und durch verschiedene Enzyme modifiziert wird. **Mns I, II** (Mannosidase I und II); **GnT I, II** (N-Acetylglucosaminyltransferase I und II); **GalT** (Galactosyltransferase) und **ST** (Sialyltransferase). (Verändert nach Nettleship *et al.* 2012)

1.4.1 Expressionssysteme für die Herstellung von Glykoproteinen

Für die korrekte Faltung von Glykoproteinen muss der Expressionswirt in der Lage sein posttranslationale Modifikationen durch das Anfügen von Zuckermolekülen an die Glykosylierungsstelle vorzunehmen. Hierfür werden meist eukaryotische Zellen

verwendet. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit das unglykosylierte Protein in *E.coli* als *inclusion bodies* zu exprimieren, welches dann im Nachhinein zurückgefaltet werden kann. Dieser Prozess ist jedoch in der Regel sehr ineffizient und aufwändig, auch wenn es mittlerweile einige Beispiele gibt, wo es mit dieser Methode gelungen ist, die Proteinstruktur erfolgreich aufzuklären (Lilie, Schwarz and Rudolph, 1998; Baneyx and Mujacic, 2004). Eine andere Methode ist die Expression des Glykoproteins im Periplasma von *E.coli* unter Verwendung des bakteriellen Signalpeptids OmpA (Kumasaka *et al.*, 2009). Darüber hinaus gibt es *E.coli*-Stämme, welche gentechnisch so verändert wurden, dass sie in der Lage sind eukaryotische Glykosylierungen vorzunehmen, wobei Glykoproteine mit der Zuckerstruktur Man₃GlcNAc₂ entstehen (Valderrama-Rincon *et al.*, 2012). Obwohl dabei bislang nur ~1 % glykosylierte Proteine gebildet werden, besitzt diese Technologie ein großes Potential für die preiswerte Produktion von Glykoproteinen mit einem definierten Glykosylierungsmuster.

Insektenzellen, wie z.B. *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* und *Drosophila melanogaster* exprimieren Proteine, welche Glykane bestehend aus Oligomannose und Paucimannose der Form α -1-6 fucosyliertes Man₃GlcNAc₂ tragen (Harrison and Jarvis, 2006). Diese kompakte, relativ homogene Glykoform eignet sich sehr gut für die Kristallisation. Es konnten schon eine Reihe von Proteinstrukturen, welche in Insektenzellen produziert worden, gelöst werden (Ramsland *et al.*, 2011). Die Glykoform ist darüber hinaus geeignet für die Behandlung mit Endoglykosidasen, z.B. Endoglykosidase H (Endo H), Endo F1 oder Endo D, welche alle in der Lage sind Oligomannose und Paucimannose abzuspalten, wodurch ein einzelnes GlcNAc zurückbleibt. Diese Deglykosylierungsstrategie wurde bereits erfolgreich für die Lösung von Proteinstrukturen verwendet (Kwong *et al.*, 1999; Fan and Hendrickson, 2005; Dias *et al.*, 2009).

Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*, werden ebenfalls für die Produktion von Glykoproteinen eingesetzt, da die sekretierten Proteine Glykosylierungen tragen, welche sensitiv gegenüber Endo H oder Endo F1 sind und sich dementsprechend für die Kristallisation eignen (Noguchi and Satow, 2006; Andersen *et al.*, 2010; Damasceno, Huang and Batt, 2012; Mattanovich *et al.*, 2012).

1.4.2 Inhibitoren und glykosylierungsdefiziente Zelllinien

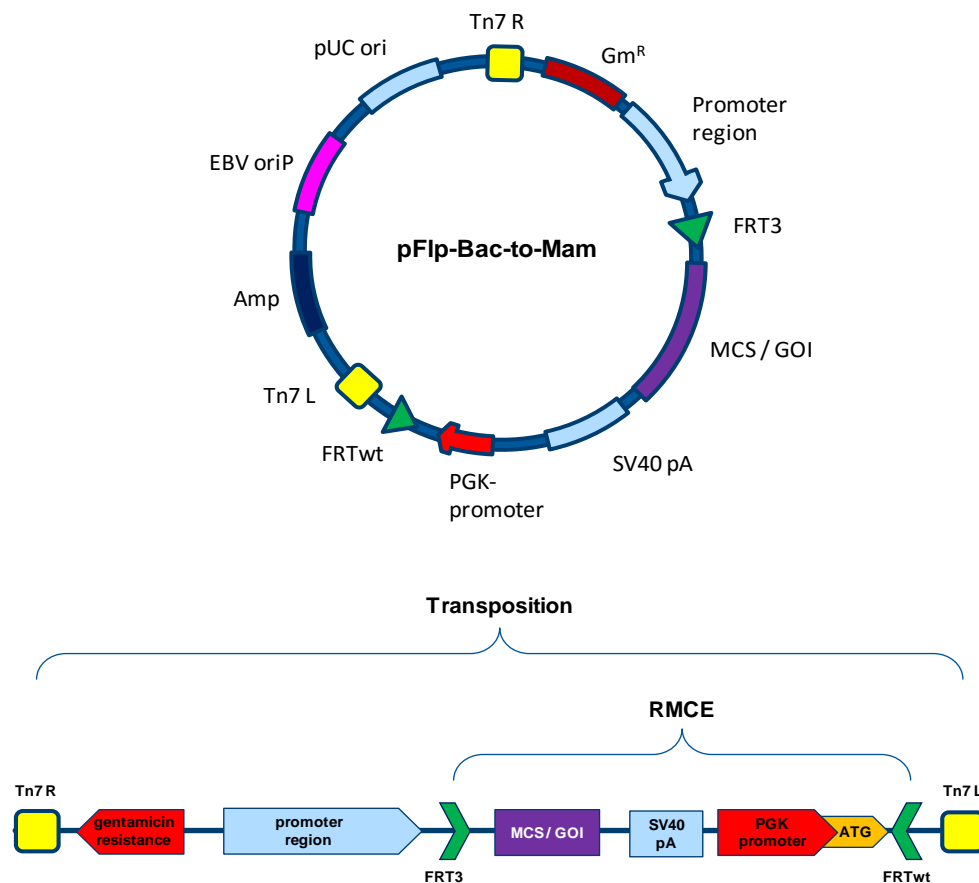
Im Gegensatz zu Insektenzellen und Pilzen produzieren Säugerzellen Glykoproteine mit komplexen Oligosaccharidketten, welche sehr heterogen sind und deshalb eher ungeeignet für die Kristallisation. Die komplette Abspaltung der N-Glykosylierungen durch die Peptid-N-glykosidase (PNGase) F kann hilfreich für die Ausbildung von Kristallen sein (Lee, Fusco and Ollmann Saphire, 2009). In der Praxis erweist sich diese Methode jedoch meist als ungeeignet, da der PNGase F Verdau oft

unvollständig ist und somit das Protein nur partiell deglykosyliert vorliegt. Darüber hinaus kann die vollständige Entfernung aller Zucker dazu führen, dass das Protein seine Löslichkeit verliert und aggregiert. Alternativ kann die Glykosylierung auch komplett durch die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin blockiert werden. Da die Glykosylierung jedoch in den meisten Fällen essentiell für die Faltung und Löslichkeit von Proteinen ist, wird diese Herangehensweise in der Regel nicht verfolgt.

Um die genannten Probleme zu umgehen, wurden weitere Verfahren entwickelt, bei denen die N-Glykosylierung während der Glykoproteinsynthese manipuliert wird. Hierbei werden prozessierende Enzyme entweder durch die Zugabe chemischer Inhibitoren blockiert oder auf DNA-Ebene inaktiviert. Es gibt drei Inhibitoren, welche bei der Produktion von Glykoproteinen für die Manipulation der N-Glykosylierung eingesetzt werden: N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ), Swainsonin, und Kifunensin. NB-DNJ inhibiert die α -Glukosidase, wohingegen Swainsonin die α -Mannosidase II blockiert, wodurch Glykoproteine entstehen, die den *high-mannose* oder *hybrid*-Zuckertyp besitzen. Diese Zuckerreste lassen sich wiederum einfach durch Endo H abspalten, wodurch die Bildung von Kristallen begünstigt wird (Davis *et al.*, 2001). Kifunensin ist der am häufigsten eingesetzte Inhibitor, da die Blockierung der α -Mannosidase I zu Glykoproteinen der Form $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ führt (Davis and Crispin, 2010) und diese Proteine die höchste Homogenität aufweisen. All diese Inhibitoren führen zur Ausbildung chemisch uniformer Glykanstrukturen, welche sich durch Endo H oder Endo F1 abspalten lassen, wodurch ein entständiger GlcNAc-Rest an der Glykosylierungsstelle verbleibt und die Löslichkeit der Proteine erhalten bleibt. Unter Verwendung von Kifunensin ist eine Deglykosylierung mit Hilfe von Endoglykosidasen für die Lösung der Proteinstruktur unnötig (Crispin *et al.*, 2009).

Neben Inhibitoren gibt es auch CHO- und HEK-Zelllinien, die eine Mutation in ihrem Glykosylierungsstoffwechselweg aufweisen. Es handelt sich dabei um eine Mutation der N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I) (Chang *et al.*, 2007; North *et al.*, 2010). Die CHO Lec3.2.8.1 Zelllinie weist vier unabhängige Mutationen in den Genen *Gne*, *Slc35a1*, *Slc35a2* und *Mgat1* auf, welche alle die Aktivität von Enzymen, welche an der Glykosylierung beteiligt sind, herabsetzen, insbesondere von GnT-I (*Mgat1*). Sie wurde ursprünglich durch die Selektion mit pflanzlichen Lektinen (*Lec*) generiert (Stanley, Caillibot and Siminovitch, 1975). Die CHO Lec 3.2.8.1 Zelllinie exprimiert hauptsächlich Glykoproteine des *high-mannose* Typs (Stanley, 1989). Die Mutation ist jedoch nicht vollständig, so dass immer noch Glykane des komplexen Typs gebildet werden (North *et al.*, 2010) und in einigen Fällen sogar nur ~10 % der produzierten Glykoproteine sensitiv gegenüber der Endoglykosidase sind (Davis and Crispin, 2010).

in HEK293-6E Zellen genutzt. Für die Verwendung als Austauschvektor (Targeting Vektor) infolge des Rekombinase gesteuerten Kassettenaustauschs (RMCE) verfügt der pFlpBtM-Vektor über dieselben heterologen FRT-Erkennungssequenzen, die auch in den CHO Lec3.2.8.1 Masterzellen (Wilke *et al.*, 2010) vorhanden sind. Darüber hinaus befindet sich auf dem Vektor ebenfalls ein PGK-Promotor und ein ATG-Startcodon für die Aktivierung der Selektionsfalle nach erfolgreichem Kassettenaustausch. Für die transiente Expression in den HEK293-6E Zellen (Durocher *et al.* 2002) trägt der pFlpBtM-Vektor den EBV-Replikationsursprung und einen CMV-Promotor. Alle pFlpBtM-Vektoren können auch als Ausgangsvektoren zur Herstellung rekombinanter Bacmide für das Bac-to-Bac oder MultiBac-System verwendet werden. Diese können anschließend für die Proteinproduktion in Insektenzellen basierend auf dem Baculovirus-Expressionssystem (BEVS) eingesetzt werden (Berger, Fitzgerald and Richmond, 2004; Hitchman, Possee and King, 2009).



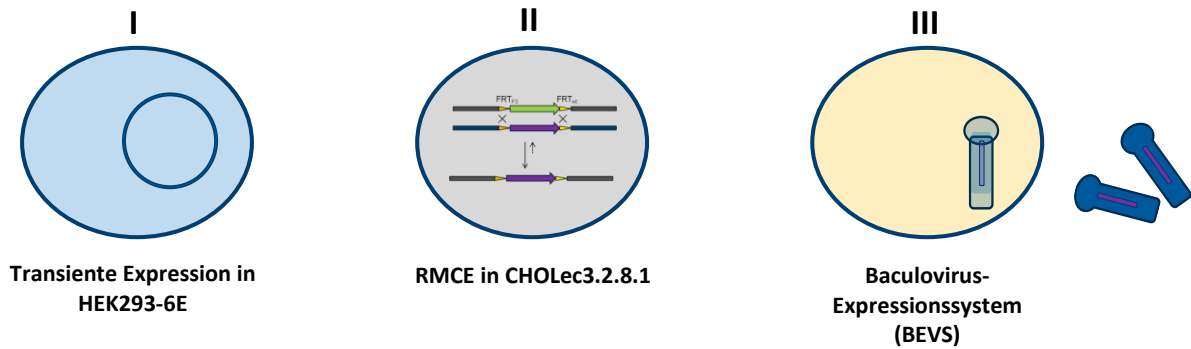


Abbildung 1-14: Übersicht über den pFlp-Bac-to-Mam-Vektor (pFlpBtM). Der pFlpBtM trägt alle notwendigen Elemente für die Expression eines beliebigen GOI in den drei unterschiedlichen Expressionssystemen: HEK293-6E, CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzellen und dem Baculovirus-Expressionssystem (BEVS). Die Expression in HEK293-6E Zellen wird durch dem CMV-Promotor und den EBV-Replikationsursprung gewährleistet. Für die Verwendung als Austauschvektor infolge des RMCE befinden sich auf dem Vektor die FRT-Erkennungssequenzen, ein PGK-Promotor und ein ATG-Startcodon für die Aktivierung der Selektionsfalle. Für die Herstellung rekombinanter Bacmide sind die Tn7-Transposon Sequenzen notwendig (Meyer *et al.*, 2013).

1.6 Modelproteine

Um die Expressionseigenschaften (Ausbeute, Stabilität etc.) verschiedener Expressionssysteme vergleichen zu können oder die Transfektionseffizienz schnell und einfach zu bestimmen werden Modelproteine verwendet. Diese müssen bestimmte Eigenschaften erfüllen um als Reporter fungieren zu können. Dazu zählen insbesondere die Exprimierbarkeit in dem entsprechenden Wirtsorganismus bzw. Zellsystem, die Abwesenheit von endogenen Homologen und die einfache und sensitive Quantifizierung mit Hilfe eines geeigneten Detektionssystems (Cullen, 2000). Im Allgemeinen werden etablierte enzymbasierte Assays für die Detektion und Quantifizierung rekombinant exprimierter Proteine eingesetzt. Diese können dann entweder direkt aus dem Zellkulturüberstand oder aus dem Zelllysat analysiert werden. Zu den bekanntesten Systemen zählen die Chloramphenicoltransferase (CAT) (Corsica and Howard, 1990), die Luciferase aus *Photinus pyralis* (Gould and Subramani, 1988) und die sekretierte Alkalische Phosphatase (SEAP) (Berger *et al.*, 1988).

1.6.1 Fluoreszierende Proteine

Für die Etablierung der neuen verbesserten CHO Lec3.2.8.1 RMCE Masterzelllinie und zur Identifizierung des erfolgreichen Kassettenaustauschs wurden die fluoreszierenden Reporterproteine eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und

tdTomato (*tandem dimer tomato*) verwendet. Die Expression dieser Proteine kann direkt mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bzw. der fluoreszenzbasierten Zellsortierung (FACS) detektiert werden. Zeitaufwändige Reinigungsschritte aus dem Zellkulturüberstand oder dem Zelllysat entfallen.

Bei eGFP handelt es sich um das bekannteste Fluoreszenzprotein, welches ursprünglich aus der Qualle *Aequorea Victoria* stammt (Shimomura *et al.* 1962). Douglas Prasher isolierte und sequenzierte 1992 die DNA von GFP (Prasher *et al.*, 1992) und legte somit den Grundstein für die Verwendung von GFP als Marker- bzw. Fusionsprotein in prokaryotischen und eukaryotischen Zellsystemen (Chalfie *et al.*, 1994). Aufgrund der herausragenden Bedeutsamkeit für die moderne Zellbiologie erhielten Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien für die Entdeckung und Weiterentwicklung des grünfluoreszierenden Proteins 2008 den Nobelpreis für Chemie.

Die räumliche Struktur wird in Abbildung 1-15 dargestellt. Das Protein ist 27.2 kDa groß und besteht aus 238 Aminosäuren, welche 11 β -Faltblätter bilden, die sich zu einer Fassstruktur (engl. *barrel*) anordnen (Ormö *et al.*, 1996). Die Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Glu67, welche sich innerhalb einer α -Helix im Inneren des β -Fasses befinden, bilden das eigentliche Chromophor durch autokatalytische Formierung eines aromatischen Systems (Heim, Prasher and Tsien, 1994). In der Qualle *Aequorea Victoria* wird GFP durch strahlungsfreien Energietransfer vom Photoprotein Aequorin angeregt. Als Reporterprotein in der Zellbiologie erfolgt die Anregung über optische Laser. Das unmodifizierte, natürlich vorkommende GFP besitzt zwei Anregungsmaxima. Das erste liegt bei einer Wellenlänge von 395 nm, das zweite bei 475 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 509 nm.

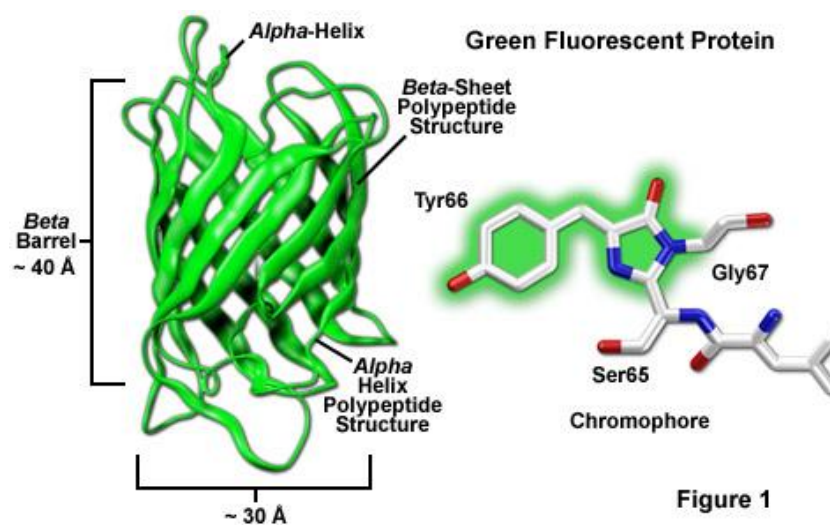


Figure 1

Abbildung 1-15: Die Struktur von GFP. Die Fassstruktur (*barrel*) von GFP wird durch 11 β -Faltblätter gebildet, welche eine α -Helix umgeben. Das Chromophor wird von den Aminosäuren S65, Y66, und E67 geformt. Das Molekül besitzt einen Durchmesser von 2,4 nm und eine Länge von 5 nm (Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/>).

Durch Mutationen der Aminosäurestruktur, welche das Chromophor bilden bzw. sich in direkter Nachbarschaft dazu befinden, konnten Moleküle mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionseigenschaften geschaffen werden. Die Mutation von S65T und F64L führte zu der Generierung einer 35-fach helleren Variante von wtGFP und wurde deshalb als *enhanced* GFP (eGFP) bezeichnet (Cormack, Valdivia and Falkow, 1996). Mutationen von Y66 verursachten eine Verschiebung der Emissionswellenlänge, wodurch die Farbvarianten Blau und Cyan entstanden sind (CFP, BFP) (Heim, Prasher and Tsien, 1994; Heim and Tsien, 1996). Inzwischen konnten auch Homologe von GFP aus verschiedenen Spezies identifiziert und charakterisiert werden. Das rot fluoreszierende Protein drFP583 wurde beispielsweise aus der Pilzkoralle *Discosoma sp.* isoliert und ist mittlerweile vor allem als DsRed bekannt (Matz *et al.*, 1999). Die Anregungswellenlänge liegt bei 558 nm und die maximale Emission kann im roten Bereich bei 583 nm gemessen werden. Um die Expressionsqualität und fluoreszierenden Eigenschaften weiter zu verbessern, wurden Mutationen innerhalb des Chromophors und in der näheren Umgebung vorgenommen. Dadurch konnten zahlreiche Varianten (siehe Abbildung 1-16) generiert werden, die sich in Helligkeit, Farbe, Stabilität und Faltgeschwindigkeit unterscheiden (Shaner, Campbell, P. A. Steinbach, *et al.*, 2004).

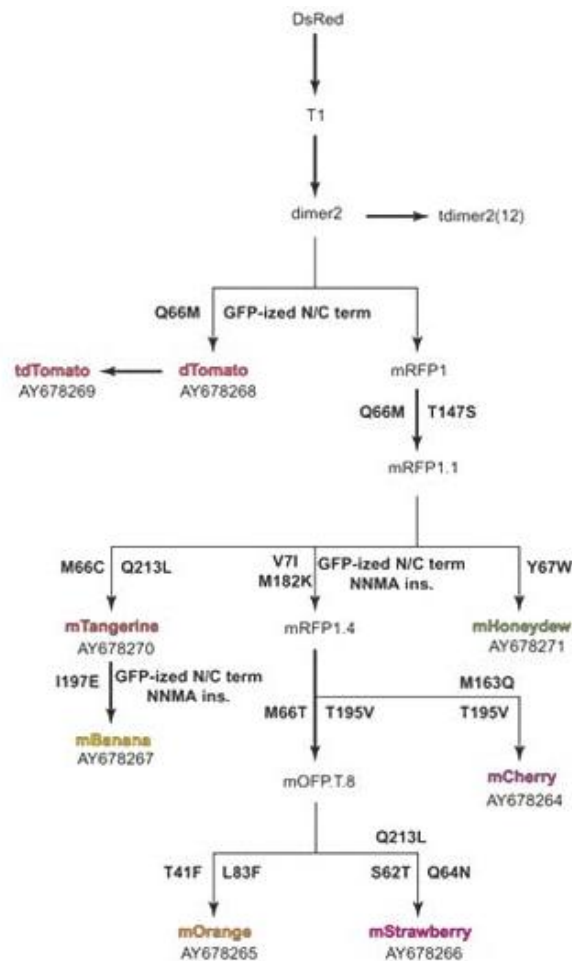


Abbildung 1-16: Genealogie von DsRed-Varianten. Dargestellt werden die verschiedenen Phänotypen und die dafür verantwortlichen Mutationen. Die Nummer unterhalb des jeweiligen Phänotypen sind die zugrundeliegenden GenBank Verweise (Shaner, Campbell, P. a Steinbach, *et al.*, 2004).

Das in dieser Arbeit verwendete tdTomato ist ebenfalls ein Abkömmling des DsRed Proteins. Es handelt sich dabei um ein kovalent verlinktes Tandemdimer von dTomato, welches dasselbe Emissionsmaximum von 581 nm besitzt, jedoch verbesserte Falteigenschaften im Vergleich zu dem physiologischen dTomato-Dimer aufweist. In Folge der Expression bildet es ein Dimer von Tandemdimeren, wodurch eine stärkere Helligkeit erreicht wird.

1.6.2 Hämagglutinin H1 von Influenza A

Bei Influenza handelt es sich um eine durch den gleichnamigen Virus verursachte Infektionskrankheit des Menschen, umgangssprachlich auch Grippe genannt. Dabei sind nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation jährlich 10 – 20 % der Weltbevölkerung betroffen. Typische Symptome sind hohes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Husten und Erbrechen. Das Gefährliche an der Influenza sind die bakteriellen Sekundärinfektionen aufgrund des geschwächten Immunsystems. Als Komplikationen kann es zu Gehirnhautentzündungen (Enzephalitiden), Entzündungen der Skelettmuskulatur (Myositis), Herzmuskelentzündungen (Myokarditiden) sowie zu einer grippebedingten Lungenentzündung (Influenzapneumonie) kommen. In ihrer schwersten Verlaufsform kann eine Influenzagrippe bei vorerkrankten, immungeschwächten Menschen auch zum Tod führen.

Bei Influenzaviren handelt es sich um RNA-Viren aus der Gruppe der Orthomyxoviridae. Man unterscheidet drei Subtypen: Influenzavirus A, B und C. Wild lebende Wasservögel stellen dabei den natürlichen Wirt für die meisten Influenza A Viren dar. Dabei können die Viren auf andere Spezies übergreifen und verheerende Ausbrüche u.a. in Geflügel- oder Schweinemastanlagen verursachen. Der Influenza A Virus ist dabei der für den Menschen gefährlichste Virus und führt zu schweren Erkrankungen. Man unterteilt den Influenza A Virus in verschiedene Serotypen, basierend auf der ausgelösten Antikörperantwort (Hay *et al.*, 2001). Dabei konnten einige Subtypen im Menschen bestätigt werden, welche bereits Auslöser schwerwiegender Pandemien waren. H1N1 führte 1918 zur Spanischen Grippe wohingegen H3N2 1968 die Grippe in Hong Kong verursachte. H und N stehen hierbei für die am häufigsten auf der viralen Oberfläche vorkommenden Glykoproteine – das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA).

HA ist ein Lektin, welches die Bindung des Virus an die Oberfläche des Wirtes und den Eintritt des viralen Genoms in die Zelle steuert. NA ist an der Freilassung der sich vermehrenden Viren aus den zuvor infizierten Zellen durch die Abspaltung von Zuckern, welche die reifen Viruspartikel binden, beteiligt (Suzuki, 2005). Insgesamt unterscheidet man 16 H (H1 – H16) und 9 N (N1 – N9) Subtypen, aber nur H 1, 2 und 3, sowie N 1 und 2 konnten bislang im menschlichen Organismus nachgewiesen werden (Lynch and Walsh, 2007).

Die Influenza-Infektion läuft in mehreren Schritten ab: Zunächst muss der Virus an die Oberfläche der Zellen binden und in sie eindringen, anschließend erfolgt die Replikation der Virusproteine und der RNA, sowie der Zusammenbau neuer Viruspartikel und abschließend die Freilassung und die Infektion benachbarter Zellen (Bouvier and Palese, 2008). Influenza-Viren binden mit Hilfe von Hämagglutinin die Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure) der Kohlenhydrat-

seitenketten von Zelloberflächenproteinen und -lipiden von Epithelzellen in der Nase, der Kehle und der Lunge (Wagner, Matrosovich and Klenk, 2002; Brankston *et al.*, 2007; Jefferson *et al.*, 2011). Nachdem Hämagglutinin durch eine extrazelluläre Protease gespalten wurde, erfolgt der Endozytose vermittelte Virusimport (Steinhauer, 1999). Nach proteolytischer Aktivierung des Hämagglutinins im Endosomen, wird das Ribonukleoprotein durch die Endosomenmembran ins Cytosol geschleust.

Hämagglutinin ist ein homotrimeres Typ I Transmembranprotein mit einer Ektodomäne, welche aus einem globulären Kopf und einer alpha-helikalen Stammregion aufgebaut ist (Wilson, Skehel and Wiley, 1981; Ha *et al.*, 2001).

Jedes Hämagglutinin-Monomer, auch als Precursor HA0 bezeichnet, besteht nach proteolytischer Spaltung aus zwei Untereinheiten: dem HA1 und dem HA2 (siehe Abbildung 1-17). Beide Untereinheiten sind miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden. HA1 stellt hierbei die globuläre Kopfdomäne des HA dar. Hier sind neben der Bindungsstelle für die Neuraminsäure auch die Antikörper-Erkennungssequenzen des Immunsystems lokalisiert. HA1 steuert die Konformationsänderung des HA. Durch Absenken des pH-Wertes im Endosomen erfolgt die Protonierung der HA1-Untereinheit. Dadurch kommt es zur gegenseitigen Abstoßung der HA1 Untereinheiten und zur Freisetzung des hydrophoben Fusionspeptids am N-Terminus der HA2-Untereinheit, welches sich als Anker an die Wirtszellmembran anheftet. Hierdurch erfolgt eine irreversible Entfaltung des HA2, wodurch die Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran ausgelöst wird (Galloway *et al.*, 2013).

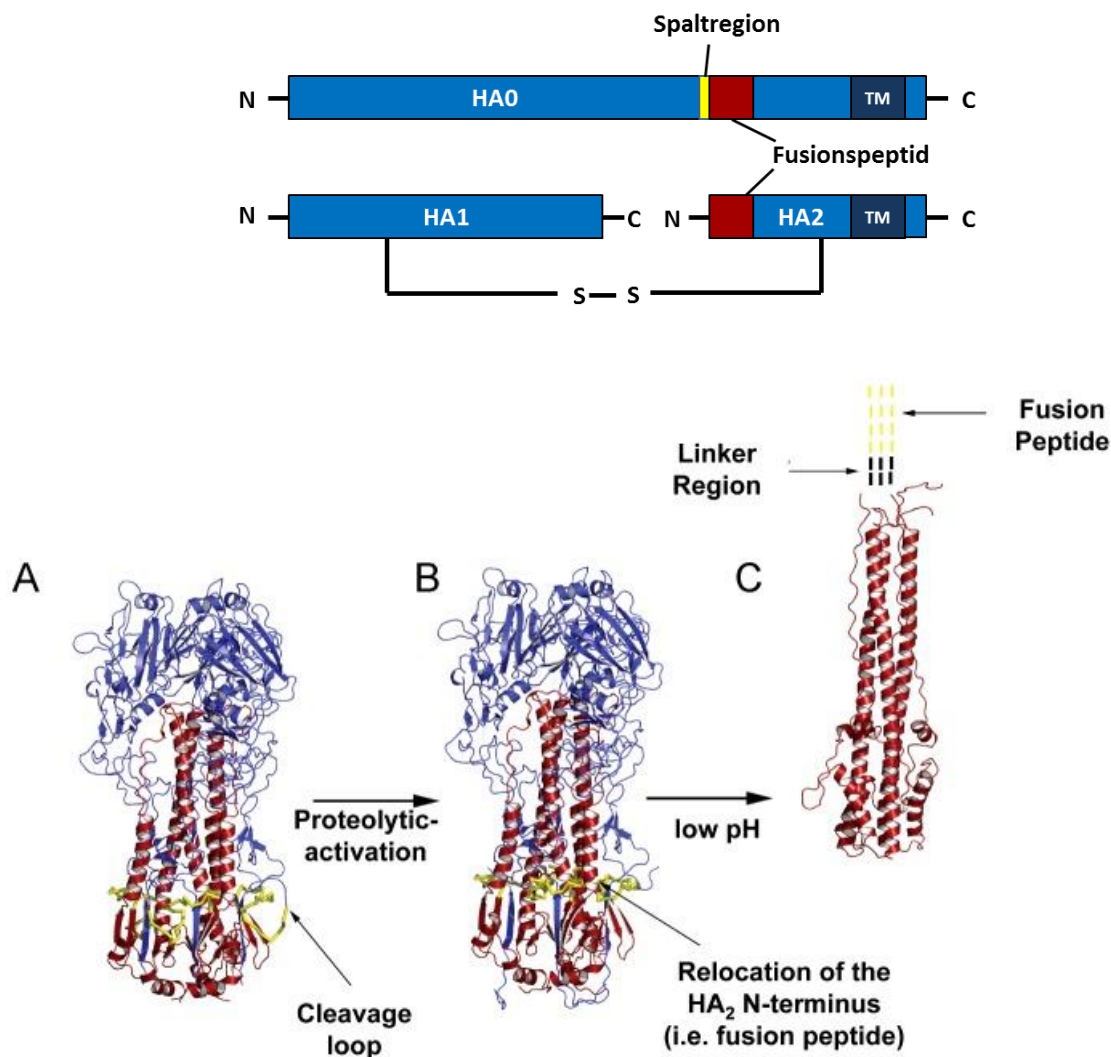


Abbildung 1-17: HA-Konformationen während der Virusvermehrung. Trimeres HA wird als Ribbon-Diagramm dargestellt. Die HA1-Untereinheit ist in Blau, die HA2-Untereinheit in Rot und das Fusionspeptid in Gelb dargestellt. (A) Die Spaltregion, welche als Substrat der aktivierenden Protease dient (*cleavage loop*) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Nach proteolytischer Aktivierung innerhalb des Loops, kommt es zu einer Umstülpung des N-Terminus der HA2-Untereinheit in das Innere des Trimers, wodurch Bindungen innerhalb der Fusionsbindungstasche entstehen. Diese metastabile Struktur dient als Vorbereitung für die Membranfusion. (C) Durch Ansäuerung im Endosomen ($\text{pH} < 6$) unterläuft HA verschiedene konformationelle Änderungen, wodurch das hydrophobe Fusionspeptid freigelegt wird und in Folge dessen die Membranfusion des Virion und des Endosoms ausgelöst wird (Galloway *et al.*, 2013).

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

| Gerät | Modellbezeichnung | Hersteller |
|------------------------------------|--|-----------------------------|
| Agarose-Gelelektrophorese | PowerPac™ 300 | Bio-Rad |
| Autoklav | Infection Control | BeliMed |
| Blot-Kammer | Trans-Blot® Turbo™ Transfer System | Bio-Rad |
| Blot-Kammer | Trans-Blot SH semi-dry transfer cell | Bio-Rad |
| Biochemischer Analysator | 2700 Select | YSI |
| Chromatographie System | ÄKTA _{FPLC} (UPC-900, P-920) | Bio-Rad |
| | ÄKTAPurifier | GE-Healthcare |
| | Profinia™ Protein Purification | |
| CO ₂ -Schüttelinkubator | Climo-Shaker ISF1-XC | Kuhner |
| Controller (Bioreaktor) | Biomodul 40B controller | VarioMag |
| | Infors HAT X-controller | Infors HT |
| Dokumentationssystem | Molecular imaging system, GelLogic 212 imaging system, 254 nm | Carestream/Kodak |
| Durchflusszytometer | Guava EasyCyte mini, 488 nm diode laser, Fluoreszent Dektektoren 583/26nm (gelb), 680/30 nm (rot) und 525/30 nm (grün) | Merck Millipore |
| Eismaschine | Sno 095294 | Ziegra |
| Elektrophorese-Kammer | Criterion Cell | Bio-Rad |
| | Mini Protean II 2-D-cell | Bio-Rad |
| | Mini Protean 3 cell | Bio-Rad |
| | Mini Protean trtra cell | Bio-Rad |
| Elektroporationssystem | Gene Pulser, Pulse Controller & Capacitance Extender | Bio-Rad |
| FACS Sorter | MoFlo XDP | Beckman Coulter |
| | Aria-II | Becton Dickinson |
| Fluoreszenzmikroskop | Evos | AMG |
| | GFP LED Cube AMEP-4651 (Em:510/42 nm) | |
| | RFP LED Cube AMEP-46 (Em: 593/40 nm) | |
| | Tx-RFP LED Cube AMEP-46 (Em: 624/40 nm) | |
| Filtrationssystem | KrosFlow Research II I TF | Spectrumlabs.com |
| | Hollow Fibre Filter Module | |
| | MidiKros 30kDa | |
| | MidiKros 10kDa | |
| | ProFlux® M12 tangential flow filtration system | Millipore |
| | VivaFlow 200, 10 000 PES | Vivascience |
| Geldokumentation | Gel Logic 212 Imaging System | Kodak |
| Inkubator | Climo-Shaker ISF1-XC | Kuhner Shaker X |
| Inkubator | HERAEUS® BB 15 CO ₂ Incubator | Thermo Electron Corporation |
| Inkubator | HERAEUS® BB 16 CO ₂ Incubator | Thermo Electron Corporation |
| Inkubator | Forma-Reach-In CO ₂ Incubator | Thermo Electron Corporation |

| | | |
|---------------------------------|---|---------------------------------------|
| Inkubator | HT Infors Minitron Shaking Incubator | Infors |
| Inkubator | HT Infors Multitron | Infors |
| Inverses Lichtmikroskop | CKX41 | Olympus |
| Kryotank | K Series Cryostorage System | Taylor-Wharton |
| Lichtmikroskop | BA200 | Motic |
| | CKX41 | Olympus |
| Magnetrührer | 1T, 47 3011-9901 und Invertoscope ID 02 | Zeiss |
| | VarioMag Mono | Thermo Scientific™ |
| | KMO2 basis, RCT basic und Colour squid | IKA |
| | RMH | Gerhard |
| | MR2000 | Heidolph |
| Nucleofector | Amxa | Lonza |
| pH-Meter | Five Easy and Seven multi | Mettler Toledo |
| Pipettierhilfe | pipetus® | Hirschmann |
| Polyacrylamid-Gelelektrophorese | Netzgerät: PowerPac™ Basic | Bio-Rad |
| Reinstwasseranlagen | MembraPure | Merck Millipore |
| | Milli! Advantage A10 | MilliPore |
| Roller-Mischer | Astacus roller mixer SRT6D | MembraPure Stuart® (Bibby-Scientific) |
| | Kammer: Mini Protean®3 Cell | Bio-Rad |
| Scanner | Canon Scan LiDE 500F | Canon |
| Schüttelheizblock | ThermoMixer® C | Eppendorf |
| Sicherheitswerkbank | Hera Safe™ KSP 15 | Thermo Scientific™ |
| Spektralphotometer | NanoDrop™ 2000c | Thermo Scientific™ |
| Sterilbank | Heraeus-Hera safe KS-12 | Thermo Electron Corporation |
| | Heraeus-Hera safe KS-15 | Thermo Electron Corporation |
| | Hera safe KSP | Thermo Scientific |
| | Maxisafe 2020 | Thermo Scientific |
| Taumel-Wipptisch | WT12 | Biometra |
| Thermozykler | T personal 48 | Biometra |
| | T professional gradient thermocycler | Biometra |
| Thermomixer | Thermomixer comfort and compact | Eppendorf |
| UV-Transilluminator | | Intas Science Imaging |
| UV-Tisch | Science imaging, 312 nm | INTAS |
| Vakuum Pumpe | 2522C-02 | Welch |
| | BVC professional | Vacubrand |
| | Laborport | KNF Lab |
| Vortex | Vortex-Genie® 2 | Scientific Industries |
| | Reax Top | Heidolph |
| | MS1 Minishaker und MS2 Minishaker | IKA |
| Waage | A200S | Sartorius analytic |
| | Combics 3, L22 and BP 3100S | Sartorius |
| | G4200-2 NM und EG 4200-2 NM | Kern |
| | XB 6200D | Precisa |
| | WT12 | Biometra |
| Wasserbad | Ecoline Staredition 003 | Lauda |
| | Combics 3, L22 und BP 3100S | Sartorius |

| | | |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------|
| | G4200-2 NM und EG 4200-2NM | Kern |
| | XB 6200D | Precisa |
| | WT12 | Biometra |
| Zellzählgerät | Casy® Cell Counter & Analyser System | Innovatis (Roche) |
| Zentrifugen | Heraeus™ Megafuge™ 40R | Thermo Scientific™ |
| | Heraeus™ Biofuge™ pico | |
| | Heraeus™ Fresco™ 17 | |
| Zentrifugenrotoren | Sorvall RC 6+ | |
| | FiberLite® F14 – 6 x 250y | Thermo Scientific™ |
| | FiberLite® F10S-6x1000 Lex | Thermo Scientific™ |
| | FiberLite® F13-14x50y | Thermo Scientific™ |
| | FiberLite® F18-12x50 | Thermo Scientific™ |

2.2 Chemikalien, Kits und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Herstellern bezogen: Amersham Biosciences, Difco, Fluka, GE Healthcare, Gibco, Invitrogen, Macherey-Nagel, Merck, Millipore, Promega, QIAGEN, Riedel de Haen, Roche, Roth, Sigma und Stratagene.

2.2.1 Enzyme und Standards für Molekulargewichte

Die verwendeten Enzyme und Standards für Molekulargewichte sind in Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Enzyme

| Enzyme | Hersteller |
|---|------------------------|
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs |
| T4 Ligase | Roche |
| Antarctic Phosphatase | Roche |
| Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2000 U/mL) | Finnzymes |
| KOD Hot Start DNA Polymerase (1000 U/mL) | Novagen/Millipore |
| Trypsin/EDTA (10x) | PAA Laborartories GmbH |

Tabelle 2.3: Standards für Molekulargewichte

| Name | Verwendung | Firma |
|---------------------------|---------------------------|--------------|
| Smart Ladder | Agarose-Gelelektrophorese | Eurogentech |
| PageRuler Plus prestained | SDS-PAGE | Fermentas |
| PageRuler unstained | SDS-PAGE | Fermentas |
| Precision Plus unstained | SDS-PAGE | BioRad |
| Precision Plus All Blue | SDS-PAGE | BioRad |

2.2.2 Kulturmedien und Zusätze

Kulturmedien für Bakterien wurden in Reinstwasser angesetzt und bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums erfolgte die Zugabe temperatursensitiver Bestandteile (0,2 µm sterilfiltriert). Die eingesetzten Antibiotika sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Zellkulturmedien und Zusätze für Säugerzellkulturen werden in Tabelle 2.6 und aufgelistet. Diese wurden entweder als fertige Lösungen gekauft oder aus Pulvergemischen in Reinstwasser angesetzt. Mit Hilfe einer speziellen „Filtrationsstraße“ (Sealkleen-Filtergehäuse, Pall), bestehend aus Nylonfiltern mit unterschiedlichen Porengrößen, erfolgte die Sterilisation.

Tabelle 2.4: Antibiotika für Bakterienkulturen

| Antibiotikum | Finale Konzentration |
|---------------------|-----------------------------|
| Ampicillin (Amp) | 100 µg/ml |
| Kanamycin (Kan) | 50 µg/ml |

Tabelle 2.5: Medien für Bakterien

| Medium | Zusammensetzung | Finale Konzentration |
|---------------|------------------------|-----------------------------|
| LB-Medium | Bacto™ Tryptone | 10 g/l |
| | Bacto™ Yeast Extract | 5 g/l |
| | NaCl | 5 g/l |
| LB-Agar | LB-Medium | - |
| | Bacto™-Agar | 16 g/l |
| SOC-Medium | Bacto™ Tryptone | 20 g/l |
| | Bacto™ Yeast Extract | 5g/l |
| | KCl | 0,186 g/l |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | NaCl | 50 mg/l |
| | Glucose | 10 mM |
| | in ddH ₂ O | |

Tabelle 2.6: Zellkulturmedien und Zusätze

| Medium | Verwendete Zelllinie | Zusätze |
|---------------|-----------------------------|--|
| CD-Hybridoma | CHO Lec3.2.8.1 / HEK293-6E | 8 mM L-Glutamine, 5% FCS |
| F17 | HEK293-6E | 7,5 mM L-Glutamine, 0,1% Pluronic F68, 25 µg/ml G418 |
| ProCHO5 | CHO Lec3.2.8.1 | 7,5 mM L-Glutamine |
| HEK-TF | CHO Lec3.2.8.1 | |

2.2.3 Transfektionsreagenzien

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen erfolgte mit Hilfe kationischer Reagenzien beziehungsweise durch Elektroporation. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2.7: Transfektionsreagenzien

| Reagenz | Verwendung | Firma |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| Polyethylenimin (linear, MW ~25 kDa) | Transfektion von HEK293-6E | Polysciences |
| Nucleofection solution I | Transfektion von CHO Lec3.2.8.1 | LONZA |
| FektoPRO® | Transfektion von CHO Lec3.2.8.1 | Polyplus |

2.3 Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Olinukleotide sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Alle Oligonukleotide, welche zum Klonieren von DNA-Fragmenten und Sequenzierungen eingesetzt wurden, stammen von MWG Eurofins Operon und sind von HPLC gereinigter Qualität.

Tabelle 2.8: Plasmide

| Tagging Vektoren |
|---|
| <p>pEF-FS-eGFP-dneo (S. Wilke, HZI) Tagging-Vektor der SMT_dneo(2)_24 Masterzelllinie, welcher stabil im Genom von CHO Lec3.2.8.1 Zellen vorliegt. Das Reportergen GFP ist durch zwei heterospezifische FRT-Sequenzen (FRT_3 und FRT_{WT}) flankiert. Die Expression wird durch den EF-Promotor gesteuert. Stromabwärts von GFP befindet sich das Promotor- und ATG defiziente Neomycinphosphotransferasegen ($\Delta neoR$). Nach erfolgreichem RMCE erfolgt die Komplementierung von $\Delta neoR$ durch das Einbringen eines Promotors und dem ATG-Start-Codon. Die Zellen werden resistent gegenüber dem Antibiotikum G418.</p> <p>pEF-FS-eGFP-dpuro (S. Wilke, HZI) Tagging Vektor, welcher von pEF-FS-eGFP-dneo abstammt. Er enthält statt $\Delta neoR$ eine Selektionsfalle für Puromycin. Der Tagging Vektor pEF-FS-eGFP-dpuro war Ausgangsmaterial für die Klonierung des in dieser Arbeit beschriebenen neuen Tagging-Vektors pSV40-HTG-dpuro.</p> <p>pSVHTGdneo (R.Schucht, InSCREENex) Tagging Vektor, welcher für die Generierung des in dieser Arbeit hergestellten verbesserten Tagging-Vektors genutzt wurde.</p> |

pSV40-HTG-dpuro

Es handelt sich um den in dieser Arbeit neu generierten Tagging-Vektor (siehe 3.2), welcher für die Erzeugung einer neuer verbesserten CHO Lec3.2.8.1 RMCE Masterzelllinie genutzt wurde.

Expressionsvektoren/ Austauschvektoren

pTT5-GFP

Dieser Vektor dient als Referenz zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei der transienten Expression in HEK293-6E-Zellen.

pFlpBtM-II(beta)-tdTomato (S.Meyer, HZI)

Austauschvektor, welcher die gesamte DNA-Sequenz des tdTomato und einen C-terminalen His-Tag aus dem Vektor ptdTomato (Clontech) enthält.

Der pFlpBtM-II ist ein vielseitig einsetzbarer Vektor, der sowohl für die gerichtete Integration mittels RMCE in die CHO Lec3.2.8.1 Masterzellen (FRT_3 und FRT_{WT}), als auch für die transiente Expression in HEK293-6E Zellen (oriP) und für die Herstellung von Bacmiden (TN7 Transpositions-Sequenzen) für die transiente Expression in Insektenzellen eingesetzt werden kann.

pexchange-tdTomato (J.Spehr, HZI)

Austauschvektor, welcher von dem FlpBtM-II-tdTomato abstammt, jedoch keine eigene Promotorregion mehr aufweist. Er wurde für den 1. RMCE-Versuch der in dieser Arbeit neu generierten Masterzellen eingesetzt um sicher zu gehen, dass die Expression des Zielgens nicht durch zufällige Genomintegration auftritt, sondern nur in Folge einer gerichteten Flippase katalysierten Austauschreaktion.

Helfer-Vektoren

pPGKFlpobpA (O54715) (Adgene plasmid 13793)

Helfervektor, welcher die Codon-optimierte (Maus) Rekombinase FlpO (Raymond and Soriano, 2007) kodiert. Nach Ko-Transfektion mit dem Austauschvektor erfolgt die gerichtete Rekombination zwischen den kompatiblen FRT-Sequenzen.

CRISPR/Cas9 Vektoren

PX458 pSpCas9-BB-2A-GFP

Dieser Vektor ist ein Geschenk von Feng Zhang vom Massachusetts Institute of Technology (Addgene plasmid # 48138).

Es handelt sich dabei um einen bicistronischen Vektor, welcher das für den Menschen Codon-optimierte Cas9 aus *S. pyogenes* (SpCas9) und ein 3' stromabwärts befindliches eGFP-Gen kodiert. Beide Gene sind über das selbst schneidende Peptid 2A verbunden und verfügen jeweils über eine eigene NLS-Sequenz für einen erfolgreichen Kerntransport.

pGS-U6-gRNA4

Vektor, welcher die guide RNA für den MGAT1 Knockout in HEK293-6E Zellen kodiert.

pGS-U6-gRNA6

Vektor, welcher die guide RNA für den MGAT1 Knockout in HEK293-6E Zellen kodiert.

Tabelle 2.9: Guide RNA-Sequenzen

| guide RNA | gRNA Sequenz 5'-3' | Target DNA-Strang |
|-----------|----------------------|-------------------|
| gRNA4 | GCTGCTGCATTATCGGCCCT | Sense-Strang |
| gRNA6 | GGCCAGGGAAAAAGTCGGTG | Antisense-Strang |

Tabelle 2.10: Oligonukleotide

| Name | Sequenz 5'-3' |
|---------------------------|---|
| SV40_BglII_for | TCCTAGATCTAGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA |
| SV40_HindIII_rev | TAATAAGCTTCCTCGAGGAGCTTTTGCAAAAGCC |
| HTG_NheI_for | TCCTGCTAGCGATCCATGAAAAAGCCTGAACCTACCCGC |
| HTG_NotI_rev | TAATGCGGCCGCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC |
| pEF-FS-GFP-dpuro_NotI_for | TCCTGCGGCCGCGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGCAG |
| pEF-FS-GFP-dpuro_NheI_rev | TCCTGCTAGCGACCGGAAATTCGAAGTTCCTATACTATTGA |
| SVHTG1_for | CTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGT |
| SVHTG2_for | CGCCGATGGTTTCTACAAAGAT |
| SVHTG3_for | TAGAAGTCGCGTCTGCGTTCGAC |
| SVHTG4_for | GCTACTTGCCAATACGGTGCGG |
| SVHTG5_for | CAACTACAAGACCCGCGCCG |
| SVHTG6_for | CTGAGCACCCAGTCCGCCC |
| SV40_for1 | CGACACGGAAATGTTGAATACTCAT |
| SV40_for2 | AGCTTGGCTGTGGAATGTGTGTC |
| dpuro_rev | CAAACAACAGATGGCTGGCAACT |
| dpuro_rev2 | AGGGCCCTCTAGATGCATGC |
| MGAT1_for1 | ATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGG |
| MGAT1_rev1 | GATCATAGCCCTCCCACGTCAG |

2.4 Bakterienstamm und Zelllinien

2.4.1 Bakterienstamm

Klonierungen für die Konstruktion neuer Plasmide oder das Einfügen von kodierenden Sequenzen in Expressionsvektoren wurden mit Hilfe des Bakterienstamms *E. coli* Top10 durchgeführt (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Verwendeter Bakterienstamm

| <i>E. coli</i> Stamm | Genotyp | Quelle |
|----------------------|--|------------|
| Top10 | F-, <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80(<i>lacZ</i>) Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i> | Invitrogen |

2.4.2 Zelllinien

Die folgenden Zelllinien fanden in dieser Arbeit Verwendung und waren Ausgangspunkt für genetische Modifikationen (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Verwendete Zelllinien

CHO Lec3.2.8.1

Bei CHO Lec3.2.8.1 handelt es sich um eine glykosylierungsdefiziente CHO Zelllinie (*Chinese Hamster Ovary*) des Klons Pro-5 (Prolin-auxotroph, ATCC no. CRL 1781), welche durch Resistenzversuche gegen pflanzliche Lektine (Lec^R) isoliert werden konnte (Stanley, 1989). Sie verfügt über vier unabhängige Mutationen in der O- bzw. N-Glykosylierung, wodurch die von diesen Zellen exprimierten Proteine verkürzte N-Glykosylierungen der Form GlcNAc₂Man₅ („high-mannose“) auf ihrer Oberfläche tragen.

HEK293-6E

Die humane embryonale Nierenepithelzelllinie HEK293 wurde 1977 durch die Transformation einer Primärkultur mit Adenovirus etabliert (Graham *et al.*, 1977). Der daraus resultierende Subklon HEK293-6E (NRC Canada) wurde durch die Integration des verkürzten Epstein-Barr nukleären Antigens 1 (EBNA1) entwickelt (Durocher *et al.*, 2002).

2.5 Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von standardisierten molekularbiologischen Methoden angewendet wie u.a. die Plasmidpräparation, PCR, Restriktionsverdau, DNA-Extraktion aus Agarosegelen, Ligation von DNA-Fragmenten oder die Transformation. Die zugrundeliegenden Protokolle stammen u.a. von (Sambrook & D.W.Russell 2000; Ausubel *et al.* 1994). Sequenzierungen generierter Plasmid-DNA wurde von der Abteilung Genomanalyse am HZI durchgeführt.

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Verwendete PCR-Kits und Reagenzien sind in Tabelle 2.13 aufgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde, neben der Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung neuer Plasmidvarianten, auch für die Überprüfung vorhandener DNA-Sequenzen auf chromosomaler Ebene eingesetzt. PCR-Reaktionen für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Insertion wurden in einem Volumen von 25 µl - 50 µl angesetzt (Tabelle 2.14). Die Durchführung, der für diese Reaktion relevanten Temperaturzyklen, fand mit Hilfe eines Thermozyklers statt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe der Agarosegel-

Elektrophorese (2.5.1) analysiert. Zur Überprüfung genomischer DNA wurde die thermostabile Polymerase KOD Hot Start verwendet (Tabelle 2.15), da diese eine hohe Genauigkeit aufweist und sehr gut für die Amplifikation von langen GC-reichen DNA-Sequenzen geeignet ist.

Tabelle 2.13: PCR Kits und Reagenzien

| Kit/Reagenz | Hersteller |
|--|---------------------------------|
| Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2.000 U/mL) | Finnzymes/Thermo Scientific/NEB |
| KOD Hot Start DNA Polymerase (1.000 U/mL) | Novogene/Millipore |
| dNTPs (10 mM) | Finnzymes/NEB |

Tabelle 2.14: PCR-Ansatz zur Klonierung

| Bestandteile (Phusion® Hot Start II HF) | Finale Konzentration |
|--|-----------------------------|
| Vorwärts-Primer | 0,5 µM |
| Reverse-Primer | 0,5µM |
| DNA_Template | 1 pg -10 ng |
| 5x Phusion ® HF Reaction Buffer | 1x |
| dNTPs | 0,2 mM |
| Polymerase | 0,02 U/µl |
| MilliQ Wasser | Endvolumen 25 µl -50 µl |

Tabelle 2.15: PCR-Ansatz für genomische DNA-Amplifikation

| Bestandteile (KOD Hot Start Polymerase) | Finale Konzentration |
|--|--|
| Vorwärts-Primer | 0,3 µM |
| Reverse-Primer | 0,3 µM |
| DNA-Template | 10 ng (Plasmid-DNA) 100 ng (genom.DNA) |
| 10x PCR KOD Reaction Buffer | 1x |
| dNTPs | 0,2 mM |
| MgSO ₄ | 1 mM |
| DMSO | 3 % |
| Polymerase | 0,02 U/µl |
| MilliQ Wasser | Endvolumen 50 µl |

Tabelle 2.16: (Gradient) Thermozykler Bedingungen für Klonierungen

| Programmschritte | Temperatur | Dauer |
|---------------------------|-------------------|----------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 98°C | 30 sec |
| 2. Denaturierung | 98°C | 5 - 10 sec |
| 3. Primerhybridisierung | 49-72°C | 30 sec |
| 4. Elongation | 72°C | 15 - 30 sec/kb |
| 5. Finale Elongation | 72°C | 5 - 10 min |
| 6. Wiederholungen | Schritt 2 - 4 | 25- 35 Zyklen |
| 7. Pause | 4°C | unendlich |

Tabelle 2.17: Thermozykler Bedingungen für genomische PCR (KOD Hot Start DNA Polymerase)

| Programmschritte | Temperatur | Dauer |
|---------------------------|---|-------------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95°C | 2 min |
| 2. Denaturierung | 95°C | 20 sec |
| 3. Primerhybridisierung | [Niedrigste Primer T _m] ^{°C} | 10 sec |
| | 70°C | Göße Amplifikat sec/kb |
| | | < 500 bp 10 sec/kb |
| 4. Elongation | | 500 - 1000 bp 15 sec/kb |
| | | 1000 - 3000 bp 20 sec/kb |
| | | > 3000 bp 25 sec/kb |
| 5. Finale Elongation | 70°C | 10 min |
| 6. Wiederholungen | 2 - 4 | 20-40 Zyklen |
| 7. Pause | 4°C | unendlich |

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die durch PCR amplifizierte oder mit Hilfe von Restriktionsenzymen generierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. 0,8 % (w/v) Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt bevor die Zugabe von Roti®-GelStain (Farbreagenz zum Anfärben von Nukleinsäuren) erfolgte. Entsprechend der Probenanzahl und -größe wurde ein entsprechender Kamm in das noch flüssige Gel gesteckt. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurden die DNA-Proben für die Beladung vorbereitet und entsprechend mit 6x DNA Ladepuffer versetzt. Durch Anlegen einer Spannung von 70 - 100 V wurden die DNA-Fragmente nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Als Referenz diente ein 1 kb Längenstandard (siehe Tabelle 2.3). Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Tabelle 2.18: Reagenzien und Puffer für Gelelektrophorese

| Reagenz/Puffer | Zusammensetzung | Hersteller |
|-------------------|----------------------|--------------------------|
| LE Agarose | | Biozymes, Lonza |
| Roti®-GelStain | | Carl Roth |
| TAE Puffer | 35,4 mM Trizma® base | Sigma |
| | 0,1 % Essigsäure | Roth |
| | 1 mM EDTA | AppliChem |
| | pH 8,5 | |
| 6x DNA Ladepuffer | | Thermo Fisher Scientific |
| Smart Ladder | | Eurogentec |

2.5.3 DNA-Extraktion

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten wurde das NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel verwendet und entsprechend des Hersteller-Protokolls angewandt.

2.5.4 DNA-Restriktionsverdau

Bei der Restriktionsspaltung schneiden Restriktionsendonukleasen des Typ II spezifisch palindromische DNA-Sequenzen präzise an bestimmten Konsensussequenzen, die in der Regel 4 bis 8 Basenpaare umfassen. Dabei entstehen sogenannte „sticky ends“ mit entweder 5′- oder 3′-überhängenden oder glatten Enden („blunt ends“). Eine Einheit des Enzyms schneidet ein µg eingesetzter DNA unter optimalen Bedingungen (in der Regel bei 37 °C) vollständig. Beim analytischen Restriktionsverdau dienen die Spaltprodukte zur Überprüfung der eingesetzten DNA. Beim präparativen Restriktionsverdau werden die Spaltprodukte für Klonierungen eingesetzt und müssen zunächst über ein 0,8 %-iges Agarose-Gel aufgetrennt und mittels DNA-Extraktion isoliert werden. Ein analytischer Restriktionsverdau umfasst in der Regel 20 µl und ein präparativer Verdau 50 µl. Dem Reaktionsansatz wird 10 % eines geeigneten 10x Puffers zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung der beiden Restriktionsansätze sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 2.19). Je nach verwendetem Restriktionsenzym und eingesetzter DNA-Menge erfolgte eine Inkubation für 1 – 2 Stunden bei 37 °C auf dem Thermozykler.

Tabelle 2.19: Restriktionsansatz

| Art des Verdau | Volumen | Reagenz |
|---------------------------------|-----------------|------------------|
| Präparativer Restriktionsverdau | x µl | DNA (0,2 - 1 µg) |
| | 2 µl | 10x NEB Puffer |
| | 2 µl (optional) | 10x BSA |
| | X µl Enzym | (1 U/µg DNA) |
| | Ad. 20 µl | MilliQ Wasser |
| Analytischer Restriktionsverdau | x µl | DNA (5 - 10 µg) |
| | 5 µl | 10x NEB Puffer |
| | 5 µl (optional) | 10x BSA |
| | X µl Enzym | (1 U/µg DNA) |
| | Ad. 50 µl | MilliQ Wasser |

Zur Verhinderung der Religation eines linearisierten Vektorrückrats ohne Insert wurden die 5′- oder 3′-überhängenden Enden mit *Antarctic Phosphatase* (AnP) dephosphoryliert. Hierfür wurden 5 µl Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (10x) und 1 µl *Antarctic Phosphatase* (5 U/ mL) zu dem Restriktionsverdau hinzugefügt und

für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 2 min erfolgt das Abstoppen der Reaktion.

2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden die in Folge des Restriktionsverdaus entstehenden komplementären überhängenden Enden von Vektor und Fragment-DNA kovalent miteinander verbunden. Diese Reaktion wird durch die DNA-Ligase (z.B. T4-DNA-Ligase) katalysiert. Für die Ligation wurden Vektorrückrat und das zu inserierende DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt. Dafür wurden in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase 80 fmol des Vektorrückgrats und 320 fmol des zu inserierenden DNA-Fragmentes bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden inkubiert. 1 - 2 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend für die Elektrotransformation (2.5.6) verwendet. Um die Häufigkeit einer Religation des Vektorrückrats und somit die Ligationseffizienz zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Reaktionsansatz ohne Zugabe des Inserts mit T4-Ligase inkubiert, der nur das entsprechende Vektorrückrat enthielt.

2.5.6 Elektrotransformation

Für die Elektrotransformation wurden die 0,2 cm Gene Pulser® Küvetten zunächst auf Eis vorgekühlt. 2 µl (~4 ng) Plasmid-DNA wurden in die gekühlten Küvetten vorgelegt mit 50 µl elektrokompenter Bakterienzellen versetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 1 - 15 min auf Eis. Für die Elektrotransformation kam der Bio-Rad Gene Pulser™ zum Einsatz. Die Transformation erfolgte bei einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Die Küvetten wurden mit einem Tuch getrocknet und in die Vorrichtung des Schlittens gespannt. Nach Anlegen des Impulses durch gleichzeitiges Betätigen der beiden roten Knöpfe erfolgte die sofortige Zugabe von 1 mL SOC-Medium (Tabelle 2.5) zu den Zellen. Die rekombinanten Bakterienzellen wurden für 1 Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, bevor 50 - 150 µl davon auf LB-Agar Platten mit geeignetem Antibiotikum (i.d.R. Ampicillin 100 µg/mL) ausgestrichen wurden. Die Kultivierung der Bakterienzellen erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

2.5.7 Kultivierung von Bakterienkulturen

Für eine Bakterienvorkultur wurden 3 ml LB-Medium mit 3 µl Ampicillin (1:1000) versetzt und durch Zugabe einer gepickten Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte

inokuliert. Die Vorkulturen wurden bei 37 °C und 130 rpm über Nacht inkubiert und nach 12 - 16 Stunden geerntet. Dieses Kulturvolumen diente einerseits für die Inokulation größerer Kulturvolumen oder für die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Plasmid Mini Prep, Promega).

2.5.8 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen wurden entsprechend des Hersteller Protokolls durchgeführt. Dabei fanden folgende Kits Anwendung (Tabelle 2.20).

Tabelle 2.20: Plasmid DNA Präparations-Kits

| Kit | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------------|
| Pure Yield™ Plasmid Mini Prep System | Promega |
| Pure Yield™ Plasmid Midi Prep System | Promega |
| NucleoSpin® Plasmid | Macherey-Nagel |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | Qiagen |

2.5.9 Präparation genomischer DNA

Für die Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen wurde die AquaGenomic™ Solution von MoBiTec verwendet und entsprechend des Hersteller-Protokolls eingesetzt.

2.5.10 Photometrische Quantifizierung von DNA und Proteinen

Bei der quantitativen Bestimmung von DNA- (260 nm) und Protein- (280 nm) Konzentrationen fand ein spezielles UV-Vis Spektrophotometer Anwendung (NanoDrop ND-1000 und der NanoDrop ND-2000), welches Messungen von Proben-volumen im Bereich von 0,5 – 2 µl ohne vorheriges Verdünnen ermöglicht. Das besondere Probenhaltesystem nutzt die Oberflächenspannung der Probe, um eine Flüssigkeitssäule zwischen zwei optischen Fasern auszubilden. Während der Messung wird ein vollständiges Absorptionsspektrum (190 – 840 nm) aufgenommen und dargestellt. Für alle Messung wurden 2 µl Probe auf den dafür vorgesehenen Messplatz aufgetragen, da dieses Volumen eine exakte Säulenbildung der Proben mit reduzierter Oberflächenspannung gewährleistet.

Für die DNA-Reinheitsbestimmung und um eine mögliche Kontamination mit Protein ausschließen zu können, wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) betrachtet. Ein Wert im Bereich von 1,8 - 2,0 entspricht dabei einer „reinen“ DNA. Niedrigere Werte deuten hingegen auf eine Proteinkontamination.

Für eine exakte Bestimmung von Proteinkonzentrationen muss das Lambert-Beersche Gesetz berücksichtigt werden. Hierfür erfolgt eine Division der erhaltenen Absorptionswerte des Spektrophotometers bei 280 nm mit dem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) jedes Zielproteins (siehe Formel). Der molare Extinktionskoeffizient kann mit Hilfe des Programms VectorNTI kalkuliert werden.

$$c \left[\frac{mg}{mL} \right] = \frac{A_{280}}{\epsilon \times l}$$

| | |
|------------|---|
| C: | Proteinkonzentration |
| A_{280} | dimensionslose Absorbtion bei 280 nm |
| ϵ | Extinktionskoeffizient [$ml \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}$] |
| l: | Schichtdicke [cm] |

2.6 Zellkultur

2.6.1 Kultivierung von Säugerzellen

Wenn nicht anders angegeben wurden die verwendeten Säugerzellen standardmäßig in Suspension in 125 mL Schüttelflaschen (Corning) mit einem Kulturvolumen von 25 - 50 mL auf einem Schüttler (HT Infors Minitron) bei 37 °C, 110 rpm und einer 5 % CO₂ nassbegasten Atmosphäre kultiviert (95 % Luftfeuchtigkeit). Medien und Zusätze für die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.6 aufgelistet. Adhärent wachsende Zellen wurden bei 37 °C und 8 % CO₂ in einem nassbegasten Brutschrank (HERAEUS® BB 15) kultiviert. Um Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, erfolgte alle 3 - 4 Tage eine Subklonierung in frisches Medium mit einer konstanten Zelldichte von 1,5 - 3 × 10⁵ Zellen/ml. Adhärent wachsende Zellen wurden nach Erreichen der Maximaldichte (geschlossener, konfluenten Monolayer) entweder auf größere Gefäße expandiert oder in einem angemessenen Verhältnis auf dasselbe Kulturvolumen verdünnt. Dies geschieht meist durch enzymatischen Verdau (Trypsin/EDTA), in Folge dessen die Zellen aus dem Monolayer herausgelöst und in Suspension gebracht werden. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als „Passagieren“.

2.6.2 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Zellzahl und Viabilität wurden mit Hilfe der Trypanblau-Färbung unter Verwendung eines Neubauer-Hämozytometers bestimmt. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und erscheinen tiefblau gefärbt. Hierfür wurden 25 µL einer Zellsuspension mit 75 µL 0.5 % Trypanblau-Lösung vermischt. Sowohl die gefärbten (tote Zellen) als auch die ungefärbten Zellen (Lebendzellen) aller 4 Großquadrate der Neubauer-Kammer wurden gezählt und in folgende Berechnung der Viabilität einbezogen:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} = \frac{\text{Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl} \times 100}{\text{absolute Zellzahl}}$$

2.6.3 Kryokonservierung

Zur dauerhaften Lagerung von Zellkulturen erfolgte eine Überführung der Zellen in geeignetes Gefriermedium und eine Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff in speziell dafür vorgesehenen Tanks. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 180 ×g für 4 min pelletiert. Nach Resuspendieren des Zellpellets in speziellem Gefriermedium (Tabelle 2.21), wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 1 × 10⁷ Zellen/ml in Kryogefäße (Nunc) überführt (1,8 mL).

Tabelle 2.21 Zusammensetzung des Gefriermediums

| Zelllinie | Zusammensetzung des Gefriermediums |
|------------------|---|
| CHO Lec3.2.8.1 | 80 % Kulturmedium |
| | 10 % DMSO |
| | 10 % 0,1%ige Methylcellulose |
| HEK293-6E | 80 % FCS |
| | 10 % DMSO |
| | 10 % Kulturmedium |

Zum schonenden Einfrieren wurde ein spezieller Einfriercontainer von Nalgene, der sog. „Mr. Frosty“ (-1 °C/min; Nalgene) gefüllt mit Isopropanol verwendet. Die Proben wurden bei -70 °C eingefroren und 24 h später in den Stickstofftank überführt.

2.6.4 Revitalisierung

Die Zellen im Kryoröhrchen wurden schnell in der Hand aufgetaut und in 10 mL vorgewärmtes Kultivierungsmedium transferiert. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension bei 180xg für 4 min zentrifugiert und in 40 mL frisches Kultivierungsmedium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.6.5 Transfektion von Säugerzellen

Für das Einbringen rekombinanter DNA in Säugerzellen wurden je nach verwendeter Zelllinie unterschiedliche Methoden angewendet.

2.6.5.1 Transfektion von HEK293-6E Zellen

Für die Transfektion von HEK293-6E Zellen fand das polykationische lineare Polymer Polyethylenimin (PEI; 25 kDa; Polysciences Inc.) Anwendung. Es gilt als das effizienteste Transfektionsreagenz für HEK293 Zellen (Huh *et al.*, 2007). Für die PEI-Transfektion von HEK293-6E Zellen wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von $1,5 - 2,0 \times 10^6$ Zellen/mL wachsen gelassen. Die Transfektion fand in Kultivierungsmedium ohne G418 statt. Hierfür wurden die Zellen bei 180xg für 4 min zentrifugiert und in frisches Kultivierungsmedium ohne G418 überführt. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Für eine erfolgreiche Transfektion wurde ein DNA:PEI-Verhältnis von 1:2,5 verwendet, wobei 1 µg DNA pro mL Zellsuspension eingesetzt wurde. Für die Ausbildung der Polyplexe wurden zunächst DNA und PEI getrennt voneinander in 1/20 des finalen Kulturvolumens in Medium ohne G418 verdünnt. Danach erfolgte die sofortige Zugabe der PEI-Lösung zu der DNA-Lösung. Das PEI/DNA-Gemisch wurde kurz mit dem Vortex-Schüttler gemischt, wobei die Bildung von Luftblasen vermieden werden sollte, und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte unter kontinuierlichem Schwenken die Zugabe der gebildeten Polyplexe zu der Zellsuspension.

2.6.5.2 Transfektion von CHO Lec3.2.8.1

Für die Transfektion von CHO Lec3.2.8.1 Zellen wurde die Nukleofektion verwendet. Sie diente neben dem stabilen Einbringen des *Tagging*-Vektors ebenfalls der Generierung der Produzentenzelllinien mittels RMCE durch den Transfer von Austausch- und Helferplasmid. Hierfür wurde das Amaxa Nucleofector Kit V von

Lonza verwendet. 1×10^6 Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei 180xg für 4 min pelletiert und in 100 μ L *Cell Line Nucleofector Solution V* aufgenommen. In einem separaten 1,5 mL Eppendorfgefäß wurden 1 μ g Austauschvektor und 4 μ g Flippase kodierender Helfervektor (RMCE) bzw. 3 μ g *Tagging*-Vektor (stabile Genom-Integration) gemischt (Tabelle 2.8). Die Zellsuspension wurde zu der DNA-Lösung gegeben und durch einmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt, bevor die Überführung in die Elektroporationsküvette erfolgte. Programm U-24 des Amaxa Nucleofectors diente zur Transfektion der verwendeten Zelllinie. Nach sofortiger Zugabe von 500 μ L vorgewärmtem Kultivierungsmedium mit Hilfe einer sterilen Einmalpipette erfolgte der Transfer der transfizierten Zellen in ein Well einer 12-Wellplatte (1,5 mL vorgelegtes Medium). Die 12-Wellplatte wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ auf dem Schüttler inkubiert (Forma Reach-In).

Alternativ zu der Standardmethode wurde in der Bachelorarbeit von Karin Landgraf (HZI, 2015) gezeigt, dass sich das kommerziell erhältliche chemische Transfektionsreagenz FectoPRO® von Polyplus ebenfalls für die Transfektion von CHO Lec3.2.8.1 Zellen eignet. Es wurde in der genannten Bachelorarbeit auf die Eignung für die transiente Proteinexpression in CHO Lec3.2.8.1 Zellen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass FectoPRO® eine durchaus effizientere Alternative zu dem Amaxa Nucleofector für den RMCE darstellt (siehe Kapitel 3.6), weshalb es in weiteren Versuchen eingesetzt wurde.

Für die Transfektion mit FectoPRO® wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen bei 180xg für 4 min pelletiert und in 1 mL HEK-TF Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Well einer 12-Wellplatte transferiert und auf dem Schüttler bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 Stunden inkubiert. Für die Transfektion wurde 2 μ g Gesamt-DNA-Menge eingesetzt. Austauschvektor und Helferplasmid wurden hierfür im Verhältnis 1:4 in einem Gesamtvolumen von 100 μ L Medium verdünnt. Es folgte die Zugabe von 2 μ L FectoPRO® zu dem DNA-Gemisch. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Das Transfektions-DNA-Gemisch wurde zu den Zellen der 12-Wellplatte hinzugegeben. Um die Proteinexpression zu steigern, erfolgte die Zugabe von 0,5 μ L FectoPRO® Booster. Die 12-Wellplatte wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ auf dem Schüttler inkubiert (Forma Reach-In).

2.6.6 Durchflusszytometrie und präparative Zellsortierung

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren zur Analyse und Charakterisierung von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die zu messenden Zellen einer Probenflüssigkeit werden mittels hydrodynamischer Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom (Hüllstrom) transportiert und in einer feinen Kapillare vereinzelt. Die Zellen

treffen im Analysepunkt auf einen Laserstrahl, wodurch es zu einer Streuung des Lichtes kommt. das Streu- bzw. Fluoreszenzlicht wird über das optische System mittels verschiedener Spiegel und Filter in einzelne Wellenlängenpakete unterteilt und den unterschiedlichen Detektoren zugeführt. Dabei findet eine simultane Detektion von Zellgröße (*forward-scatter*), Granularität (*side scatter*) und Fluoreszenz statt. Die dabei generierten Signale werden von einer Software ausgewertet und als Histogramme oder Scatterplots dargestellt. Zellen mit ähnlichen Eigenschaften können so identifiziert, als Populationen definiert und in sog. *gates* markiert werden. Anhand der Anzahl fluoreszenter Zellen (z.B. GFP-positiv) ist es möglich Aussagen über die Transfektionseffizienz von Expressionsversuchen zu treffen.

Für die Untersuchung des Fluoreszenzlevels eukaryotischer Zellen nach erfolgter transienter Transfektion oder stabiler Genintegration von Zielgenen wurde das Guava EasyCyte™ Mini System verwendet. Es handelt sich dabei um ein Durchflusszytometer mit einem Argonlaser (siehe Tabelle 2.22). Die zu vermessenden Proben wurden 1:10 in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit 1x PBS verdünnt und auf dem Vortex-Schüttler gemischt.

Als Erweiterung der analytischen Durchflusszytometrie wird die Zellsortierung genutzt, um spezifische Zelltypen aus einer heterogenen Suspension zu isolieren. Bei der Zellsortierung werden die Zellen im Flüssigkeitsstrahl nach Passieren des Lasers in Einzeltropfen abgeschnürt. Kurz bevor der Zelltropfen abreißt erhalten diese entsprechend der vorher festgelegten Sortierkriterien unterschiedliche Ladungen. In der nachfolgenden Fallstrecke werden sie beim Passieren eines elektrischen Feldes, welches durch einen Plattenkondensator erzeugt wird, unterschiedlich abgelenkt und können so getrennt gesammelt werden. Präparative Zellsortierungen wurde mit dem BD FACS Aria II™ SORP (Tabelle 2.22) unter Einsatz der 100 µm Nadel von Lothar Gröbe in der Arbeitsgruppe Experimentelle Immunologie (EXIM) am HZI durchgeführt. Für die Zellsortierung wurden 1×10^7 Zellen bei $180 \times g$ für 4 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 mL Sortierlösung (1x PBS mit 2 % FCS, 1 % Pluronic und 1x Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. 5% der am stärksten GFP-fluoreszierenden Zellen wurden als Pool in 5 mL Sortierlösung aufgefangen. Die positiven Zellen wurden erneut zentrifugiert und in frisches Kultivierungsmedium mit FCS aufgenommen und in ein Well einer 48-Wellplatte ausgesät. Nach 2 - 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen schrittweise expandiert und nach ca. 4 Wochen in Suspension überführt und kryokonserviert.

Tabelle 2.22: Parameter der eingesetzten Durchflusszytometer

| Durchflusszytometer | Markerprotein | Anregungslaser | Detektor |
|----------------------|---------------|----------------|---------------|
| Guava EasyCyte Mini | eGFP / YFP | 488 nm | 525/30 (grün) |
| | tdTomato | 488 nm | 583/26 (rot) |
| BD FACS Aria II SORP | eGFP | 488 nm | 525/50 (grün) |

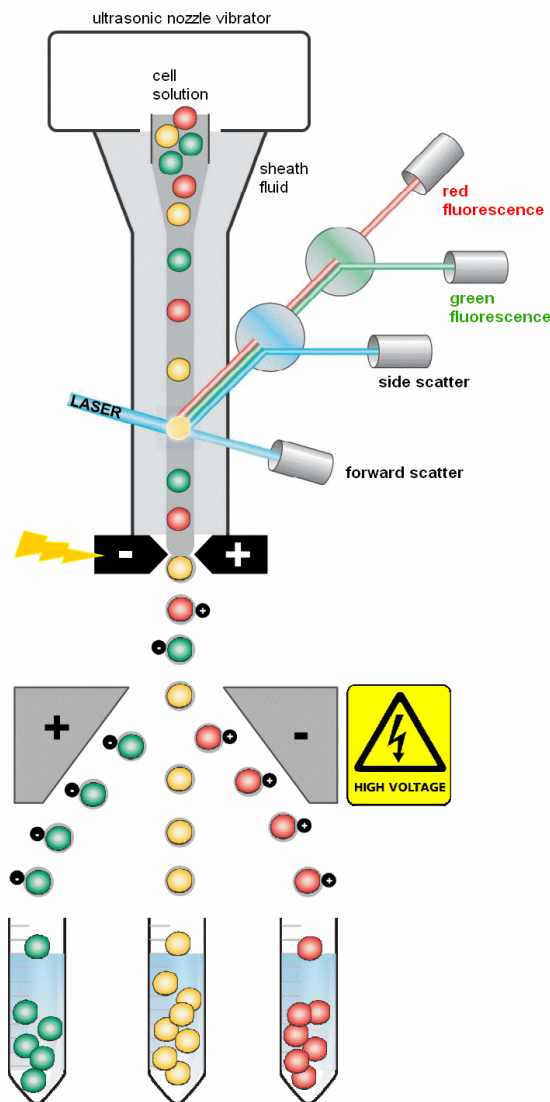


Abbildung 2-1: Das Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Zellen werden in einem Hüllstrom transportiert und passieren einen Laserstrahl, wodurch eine gleichzeitige Detektion von Zellgröße, (*Forward Scatter*), Granularität (*Side Scatter*) und Fluoreszenz ermöglicht wird. Dies wird durch das Vorhandensein eines Photoelektronenvervielfachers auf Ebene des Laserstrahls sowie im 90° Winkel dazu erreicht. Ein piezoelektrisches Element sorgt für das Abschnüren der einzelnen Zellen in kleine Tropfen. Diese werden entsprechend der Sortierparameter elektrisch geladen und können so in einem elektrischen Feld abgelenkt und in bis zu 4 Pools gesammelt werden. (Original von: L. Gröbe, HZI).

2.6.7 Generierung der verbesserten CHO-Masterzelllinie

Um die Austauscheffizienz der CHO Lec3.2.8.1 RMCE Masterzellen zu erhöhen und die Zeit bis zur finalen Produzentenzelllinie zu verkürzen wurde eine neue Generation Masterzellen entwickelt. Hierfür wurde der optimierte *Tagging*-Vektor pSV40-FS-HTG-dpuro mittels Amaxa Nucleofector™ System (2.6.5.2) in die CHO Lec3.2.8.1 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ auf dem Schüttler kultiviert. Nach 24 h erfolgte eine Zentrifugation bei 180 x g für 4 min. Das Zellpellet wurde in 10 mL CD-Hybridoma mit 5 % FCS resuspendiert und in ein Well einer 12-Wellplatte transferiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 8 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h erfolgte unter Zugabe von 500 µg/ml Hygromycin B eine Selektion der rekombinanten Zellen. Alle 2 - 3 Tage wurde ein Mediumwechsel unter Anwesenheit von Antibiotikum durchgeführt. Nach weiteren ~3 Wochen wurden ~1 x10⁷ Zellen auf die höchsten 5 % der GFP-positiven Zellen mittels FACS sortiert (2.6.6). Die sortierten Zellen wurden schrittweise expandiert bis sie eine ausreichende Zellzahl für eine weitere FACS-Sortierung aufwiesen. Zur Herstellung einer klonalen Zelllinie wurden Einzelklone isoliert und auf Langzeitstabilität überprüft. Nur unter kontinuierlicher Antibiotika-Selektion mit Hygromycin B konnte eine stabile GFP-Expression mit Hilfe des Guava EasyCyte™ Durchflusszytometers nachgewiesen werden.

2.6.8 Generierung der HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie

Einen Tag vor der Transfektion wurden $1,3 \times 10^5$ HEK293-6E Zellen bei 180 x g für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 600 µl CD-Hybridoma Medium mit 5 % FCS resuspendiert und in ein Well einer 24-Wellplatte überführt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 8% CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wiesen die nun adhärent wachsenden Zellen eine Konfluenz von 70 - 90% auf. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und gegen 540 µl frisches Medium ohne FCS ausgetauscht. Im nächsten Schritt erfolgte die Vorbereitung der PEI und DNA-Lösung in separaten 1,5 ml Eppendorf Gefäßen. Dazu wurden 1,5 µg PEI in einem totalen Volumen von 30 µl Medium verdünnt. In einem weiteren Probengefäß erfolgte die Verdünnung der DNA in ebenfalls 30 µl Medium. Insgesamt wurden 600 ng DNA verwendet, wobei alle Plasmide in einem äquimolaren Verhältnis (gRNA4, gRNA6 und der pSpCas9-2A-GFP) eingesetzt wurden. Für die Vorkomplexierung der DNA erfolgte die Zugabe der PEI-Lösung zu der DNA-Lösung. Nach einer kurzen Durchmischung auf dem Vortex-Schüttler und einer anschließenden Inkubation von 30 min wurde das PEI/DNA-Gemisch vorsichtig am Rand der adhärent wachsenden Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss über Nacht bei 37 °C und 8 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen

mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 200 µl Sortierungslösung (siehe 2.6.6) vollständig resuspendiert. Anschließend wurden alle GFP-positiven (Cas9-exprimierenden) Zellen in 2 Wells einer 48-Wellplatte mit Hilfe des FACS BD Aria-II-SORP von Lothar Groebe sortiert. Die Zellen wurden schrittweise expandiert und klonal vereinzelt, bis sie eine ausreichende Zellzahl erreicht hatten um sie in Suspensionskultur zu überführen. Hierfür wurden die Zellen zunächst vom Medium befreit, mit 1x PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Nach einer Zentrifugation von 4 min bei 180 x g wurden die Zellen in frisches F17-Medium aufgenommen und bei 37 °C, 110 rpm und 5 % CO₂ kultiviert bis sie für eine Langezeitlagerung kryokonserviert wurden (siehe 2.6.3).

2.6.9 Generierung von Produzentenzelllinien mittels RMCE

Um eine exponentielle Wachstumsphase zum Zeitpunkt der Transfektion zu gewährleisten wurden die RMCE Masterzelllinien SMT_dneo(2)_24 3 Tage vor der Nukleofektion auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt. Die Transfektion wurde wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen bei 180xg für 4 min pelletiert und in 10 mL CD-Hybridoma Medium (inkl. Zusätze siehe 2.2.2) resuspendiert und in eine 100 mm Zellkulturplatte für adhärentes Wachstum transferiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 8 % CO₂ inkubiert. Alle 2 - 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Ab dem 5. Tag wurden die Zellen durch Zugabe von 2 mg/mL Geneticin (G418) selektioniert. Nach 10 - 14 Tagen wurden die sich bildenden Zellklone gepickt und in ein Well einer 96-Wellplatte überführt. Die Zellen wurden dabei weiterhin adhärent unter Anwesenheit von Antibiotikum kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von 50 % - 80 % Konfluenz wurden die positiven Klone isoliert und expandiert. Falls nach Betrachtung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop jedoch noch GFP-positive Zellen in den isolierten Klonen enthalten waren, wurde eine serielle Verdünnung wie in Kapitel 2.6.10 beschrieben, durchgeführt. Die positiven isolierten Klone wurden schrittweise bis auf eine 6-Wellplatte expandiert. Um die Zellen in Suspension zu überführen, wurden diese mittels Trypsin/EDTA abgelöst, bei 180 x g für 4 min pelletiert und in ProCHO5 Medium mit 0,01 U/ml Heparin (Vermeidung von Zellklumpen) resuspendiert. Durchflusszytometrie (GUAVA) wurde verwendet um den erfolgreichen Kassettenaustausch und den damit verbundenen Verlust des stabil integrierten fluoreszierenden Markergens GFP zu überprüfen.

2.6.10 Einzelzellklonierung

Für die Generierung klonaler Zelllinien wurde eine serielle Verdünnung in 96-Wellplatten durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl CD-Hybridoma Medium (inkl. Zusätze siehe auch 2.2.2) in jedes Well, mit Ausnahme von A1, der 96-Wellplatte transferiert und bei 37 °C und 8 % CO₂ für 15 min inkubiert. In A1 wurden 200 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen pipettiert. Mit einer Einkanalpipette wurden 100 µL aus A1 in B1 transferiert und durch einmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Diese 1:2-Verdünnung wurde bis H1 fortgeführt. Die überschüssigen 100 µl aus H1 wurden verworfen. Das finale Volumen wurde durch die Zugabe von 100 µl frischem Medium auf 200 µl erhöht (A1 – H1). Mit einer Multikanalpipette erfolgte eine 1 : 2 Verdünnung in waagerechter Richtung von A1 – H12. Die überschüssigen 100 µl wurden am Ende wieder verworfen. Alle Löcher wurden auf ein Endvolumen von 200 µl mit Medium aufgefüllt. Die 96-Wellplatte wurde für eine Woche bei 37 °C und 8 % CO₂ inkubiert. Das Wachstum der Klone konnte unter dem Mikroskop verfolgt werden. Wells, in denen nur eine Kolonie gewachsen war, wurden in weiteren Versuchen verwendet. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte eine schrittweise Expansion der Zellklone.

2.7 Proteinproduktion und Reinigung

2.7.1 Transiente Proteinexpression in HEK293-6E

Um die neu generierte HEK293-6E MGAT1 k.o. Zelllinie im Hinblick auf eine verkürzte N-Glykosylierung rekombinant exprimierter Proteine zu untersuchen und mit der HEK293-6E Ausgangszelllinie zu vergleichen wurden transiente Expressionen von Modelproteinen durchgeführt. Die Transfektion erfolgte wie bereits in Kapitel 2.6.5.1 beschrieben. Die Transfektionseffizienz wurde täglich mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen (2.6.6). Darüber hinaus wurden alle 24 h Proben des Kulturüberstandes genommen und für weitere Untersuchungen bei -20 °C gelagert. 48 h nach Transfektion (hpt) erfolgte eine Volumenverdopplung mit frischem F17-Medium und eine Zugabe von Trypton (TN1) in einer finalen Konzentration von 0.5 %. 72 hpt wurden der Kultur 4.5 g/L Glucose zugefügt um einen Nährstoffverbrauch vorzubeugen. Um nach Erreichen der stationären Phase, in der die Zelldichte ihr Maximum erreicht hatte, die Expression weiter zu erhöhen erfolgte 96 hpt die Zugabe von 3.75 mM Valproinsäure (G. Backliwal *et al.*, 2008). Nach spätestens 168 h erfolgte die Ernte des Kulturüberstands durch Zentrifugation von 15 min und 1000 x g. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung des zellfreien Überstandes bei 4 °C und unter Zugabe von 0,1 % Natriumazid.

2.7.2 Aufkonzentrieren von Proteinen mittels VivaSpin

Um Proteine aufzukonzentrieren oder Puffer im kleinen Maßstab auszutauschen wurden VivaSpin 2, 6 und 20 Konzentratoren mit geeignetem Ausschlussgrenzen (siehe Tabelle 2.23) mit einer Polyethersulfon-Membran (PES) entsprechend des Hersteller Protokolls verwendet. Proteinlösungen wurden hierfür je nach Volumen in einem Ausschwing- oder Festwinkelrotor (Tischzentrifuge) ultrazentrifugiert.

Tabelle 2.23: VivaSpin Konzentratoren

| Konzentrator | MWCO | Max. Geschwindigkeit | Zentrifuge | Hersteller |
|---------------------|-------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------------|
| VivaSpin 20 | 10 000 Da | 5000 x g | Ausschwingrotor | Vivascience/ Satorius Stedim |
| VivaSpin 20 | 30 000 Da | 5000 x g | Ausschwingrotor | Vivascience/ Satorius Stedim |
| VivaSpin 6 | 10 000 Da | 5000 x g | Ausschwingrotor | Vivascience/ Satorius Stedim |
| VivaSpin 2 | 10 000 Da | 12000 x g | Festwinkelrotor | Vivascience/ Satorius Stedim |
| VivaSpin 500 | 10 000 Da | 15000 x g | Festwinkelrotor | Vivascience/ Satorius Stedim |

2.7.3 Aufreinigung mit magnetischen Beads

Um kleine Mengen His-markierter Proteine aus dem Zellkulturüberstand aufzureinigen bzw. aufzukonzentrieren erfolgte die Verwendung magnetischer Beads (MagneHis™ Ni-Particles, Promega). Hierfür wurden 30 µl resuspendierte Beads zu 1 ml zellfreien Kulturüberstand hinzugegeben und für 2 min inkubiert. Die magnetischen Beads, welche das His-markierte Protein gebunden hatten, wurden mit einem Magnetständer zurückgehalten und 3 x mit MagneHis™ Binding/Wash Buffer, versetzt mit 500 mM NaCl, gewaschen. Das gereinigte Protein wurde durch die Zugabe von 50 – 100 µl MagneHis™ Elution Buffer eluiert und mit Hilfe von SDS-PAGE bzw. Westernblot überprüft.

2.7.4 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung

Für eine erste Überprüfung der Proteinexpression wurden kleine Volumen Kulturüberstand mittels Trichloressigsäure gefällt und mittels Westernblot

analysiert. Hierfür wurde 1 ml Zellkulturüberstand mit 100 µl 100 % TCA für 30 min auf Eis inkubiert. Das präzipitierte Protein wurde bei 13 000 rpm für 15 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 1 ml eiskaltem 70 %-igen Ethanol und eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm. Das Proteinpellet wurde in 50 µl Wasser und 50 µl 2 x Laemmli-Puffer gelöst.

2.7.5 Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen erfolgte durch die Verwendung von kommerziell erhältlichen Chromatographiesäulen (siehe Tabelle 2.24). Da alle rekombinant exprimierten Proteine über einen C-terminalen Polyhistidin-Tag verfügten, konnten sie mit Hilfe der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Dabei ist ein zweiwertiges Metallion (Nickel oder Cobalt) an einen Feststoff-gekoppelten Chelator immobilisiert (Nitrilotriessigsäure-Agarose; kurz: NTA-Agarose). Ni^{2+} kann im Austausch gegen Wasser mit zwei Histidin-Resten des Proteins interagieren. Nach Entfernung unspezifischer Proteine, kann das Protein durch einen Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert werden.

Zur präparativen Reinigung im kleinen Maßstab fand das automatisierte Profinia Protein Purification System (Biorad) Anwendung. Für eine Proteinreinigung im großen Maßstab wurde die ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) verwendet. Säulen und Puffer sind in Tabelle 2.24 und in Tabelle 2.25 aufgeführt. Alle Puffer wurden zuvor sterilfiltriert (0,2 µm) und entgast. Um das Strippen von Ni^{2+} -Ionen von der Säule durch Chelationen aus dem Zellkulturmedium zu verhindern, wurde dieses gegen einen geeigneten Dialysepuffer ausgetauscht. Später konnte dieser zeitaufwändige Dialyseschriff eingespart werden, da spezielle Säulen zur Aufreinigung von His-markierten Proteinen direkt aus dem Zellkulturüberstand eingesetzt wurden (His-Trap Excel™).

Tabelle 2.24: Säulen für Affinitätschromatographie

| Säule | Volumen | Hersteller |
|-------------------------------------|-----------|---------------|
| Bio-Scale Mini Profinity™ IMAC | 1 ml/ 5ml | Bio-Rad |
| Bio-Scale Mini Bio-Gel P6 Desalting | 10 ml | Bio-Rad |
| His-Trap HP™ | 5 ml | GE Healthcare |
| HiTrap TALON crude | 1 ml | GE Healthcare |
| His-Trap Excel™ | 1 ml | GE Healthcare |

Tabelle 2.25: Puffer für die Affinitätschromatographie

| Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| Bio-Scale Mini Profinity™ IMAC: | |
| 2× Cleaning solution 1 | 1 M NaCl, 100 mM Tris, pH 8 |
| 4× Cleaning solution 2 | 1 M NaCl, 400 mM NaOAc, pH 4.5 |
| 2× Storage solution (desalting column) | 4 % benzyalkohol |
| 5× Desalting buffer | PBS pH 7 |
| 2× IMAC Wash buffer 1 | 600 mM KCl, 100 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Imidazol, pH 8 |
| 2× IMAC Wash buffer 2 | 600 mM KCl, 100 mM KH ₂ PO ₄ , 20 mM Imidazol, pH 8 |
| 2× IMAC Elution buffer | 600 mM KCl, 100 mM KH ₂ PO ₄ , 500 mM Imidazol, pH 8 |
| His-Trap HP: | |
| Äquilibrierungspuffer | 50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl |
| Waschpuffer | 50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol 500 mM |
| Elutionspuffer | 50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, Imidazol 500 mM |
| His-Trap Excel™: | |
| Äquilibrierungspuffer | 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,4 |
| Waschpuffer | 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,4, 0-30 mM Imidazol |
| Elutionspuffer | 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,4, 500 mM Imidazol |
| HiTrap TALON crude: | |
| Äquilibrierungspuffer | 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl 1, pH 7.4 |
| Waschpuffer | 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl 1, pH 7.4, 5 mM Imidazol |
| Elutionspuffer | 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl 1, pH 7.4, 150 mM Imidazol |
| Dialysepuffer | 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl |

2.7.6 Gelfiltration

Gelfiltration oder Größenausschlußchromatographie trennt Moleküle nach ihrer Größe und Form auf schonende Art über eine spezielle Gelmatrix auf. Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales Netzwerk aus polymeren organischen Verbindungen (z.B. Dextran, Agarose o.ä.). Die Matrix ist mit hydrophilen Poren durchsetzt und steht mit einem Lösungsmittel im Gleichgewicht. Große Moleküle passieren diese Matrix schneller als kleine Moleküle.

Die Gelfiltration wurde zur Abtrennung des durch Thrombin abgespaltenen Protein-Tags von H1 unter Verwendung der ÄKTApurifier eingesetzt. Bei der Säule handelte es sich um eine Superdex 200 Increase 10/300 GL. Das vorgereinigte Protein wurde auf 500 µl mit einer Vivaspin 2 (10 000 MWCO) aufkonzentriert und mittels 1 mL Probeschleife auf die Säule aufgetragen, nachdem diese mit Puffer und Wasser äquilibriert wurden war. Die Auftrennung des Proteins erfolgte mit einer Flussrate von 0,3 ml/min. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und mit SDS-PAGE analysiert.

2.7.7 Kristallisation

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur größerer Proteine oder Protein-komplexe findet die Röntgenstrukturanalyse (engl. *X-Ray diffraction*) Anwendung. Hierfür müssen Proteine als ausreichend große Einkristalle vorliegen. Die Parameter, welche die Kristallisation von Proteinen beeinflussen können, sind u.a die Konzentration des Proteins, die Puffer- und pH-Wert-Bedingungen, sowie die Temperatur. Die Löslichkeit eines Proteins hängt von vielen Variablen des Proteins und der Bestandteile des Fällungsmittels ab. Da es sich bei Proteinen um sehr flexible Moleküle handelt, die in der Lage sind verschiedene Konformationen anzunehmen, müssen die für die Kristallisation geeigneten Bedingungen in langen Versuchsreihen ermittelt werden. In der Praxis wird zumeist eine reine hochkonzentrierte Proteinlösung (2 -20 mg/ml) mit einem Fällungsmittel versetzt. Dies geschieht in der Regel in einem Schritt als „Batch“-Versuch. Generell sind Proteine in Lösungen mit niedriger Ionenstärke besser löslich als in reinem Wasser (*salting-in* Effekt), jedoch können sie durch hohe Salzkonzentrationen (z.B. Ammoniumsulfat) ebenfalls ausgefällt werden (*salting-out* Effekt). Ein Schema des Löslichkeitsverhaltens zeigt Abbildung 2-2.

Bei der Kristallisation unterscheidet man zwei Schritte: 1. die initiale Keimbildung (Nukleation) und 2. das Kristallwachstum. Beide Schritte erfolgen in einem Bereich des Phasendiagramms, der als übersättigte Lösung bezeichnet wird. Allerdings benötigt man ein höheres Maß an Übersättigung für die Keimbildung (labile Zone) als für das Kristallwachstum (metastabile Zone). Bei der Kristallisation scheidet sich ein Stoff nach initialer Keimbildung aus einer übersättigten Lösung so lange aus, bis das thermodynamische Löslichkeitsprodukt erreicht ist.

Die oft verwendete Methode zur Proteinkristallisation ist die Gasphasendiffusion, entweder als hängender oder sitzender Tropfen. Ein Tropfen Proteinlösung wird mit einem Tropfen Präzipitant gemischt. Der Tropfen des Gemisches wird in einer luftdichtverschlossenen Multiwell-Platte gegen ein Reservoir des Präzipitants äquilibriert. Der Dampfdruck des Wassers im Tropfen ist höher als der Dampfdruck im Reservoir, so dass langsam Wasser aus dem Tropfen in die Reservoirolösung durch

die Gasphase diffundiert. Dieser Prozess dauert abhängig vom verwendeten Präzipitant Stunden bis Tage und führt langsam zu einer Übersättigung des Proteins im Tropfen und im besten Fall zu einer Kristallbildung.

Proteinkristalle bestehen aus sich periodisch wiederholenden „Einheitszellen“, die in einem regelmäßigen dreidimensionalen Gitter angeordnet sind. Die Form der Einheitszelle sowie die Symmetrieeigenschaften ihres Inhalts bestimmen die sog. Raumgruppe des Kristalls. Die „Hohlräume“ zwischen den Proteinmolekülen sind mit Puffer/Wasser gefüllt (30% - 70%) und bilden den Kristall durchziehende Flüssigkeitskanäle. Dies macht man sich u.a. bei der Lösung des Phasenproblems zu Nutze, bei welcher nachträglich niedermolekulare Substanzen in den Kristall eingebracht werden, z.B. Enzymsubstrate, Inhibitoren, Farbstoffe oder Schwermetallsalze.

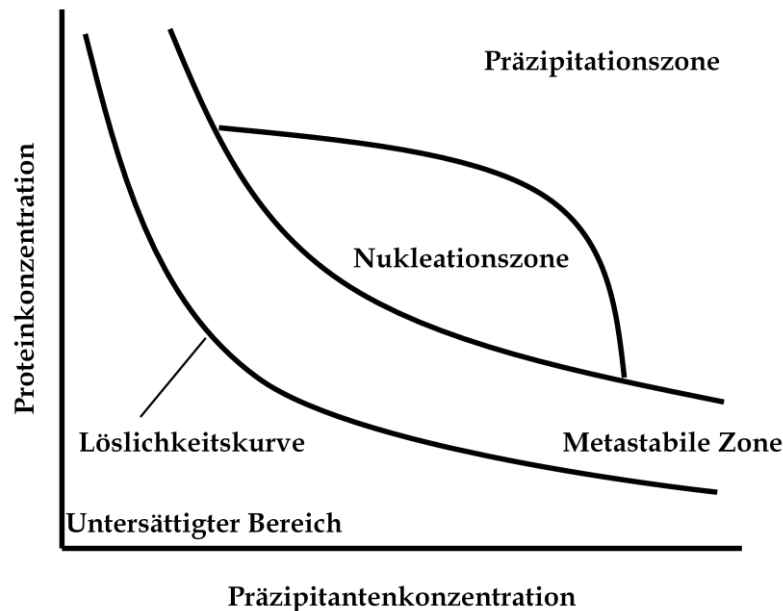


Abbildung 2-2: Phasendiagramm bei der Kristallisation.

Da H1 bereits erfolgreich aus Insektenzellen durch Margitta Schürig (RPEX, HZI) kristallisiert werden konnte, wurden für den initialen Kristallisationsversuch des H1 aus den HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen dieselben Kristallisationsbedingungen verwendet. Hierfür fand der kommerziell erhältliche Screen JSCGplusTM (Molecular Dimensions) Anwendung. In einer 96 Wellplatte wurde pro Bedingung eine Proteinkonzentration von 10 mg/mL mit Hilfe der sitting-drop Gasphasendiffusion getestet. Hierfür wurden 15 µl Protein- mit 15 µl Reservoirlösung mit Hilfe des Pipettierroboters MOSQUITO (TTP LabTech Ltd.) gemischt. Die Platten wurden luftdicht verschlossen (MancotTM Crystal Clear tape) und bei 19 °C inkubiert.

2.8 Proteinanalyse

2.8.1 SDS-PAGE

Für die Analyse der Ausbeute und Reinheit der exprimierten und gereinigten Proteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (diskontinuierliche Elektrophorese) unter denaturierenden Bedingungen verwendet (Laemmli, 1970). Dabei werden die Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Kleine Proteine wandern schneller durch die Poren des Gels, wohingegen größere Proteine eher zurückgehalten werden. SDS dient hierbei für die Überdeckung der Eigenladung der Proteine.

Für die Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit 8x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Dies führt zu einer Linearisierung der zuvor gefalteten Proteine durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen. Für die Proteinauftrennung wurden entweder 10 %-ige oder 12 %-ige SDS-Gele eingesetzt. Diese waren entweder selbst gegossen (siehe Tabelle 2.26 und Tabelle 2.27) oder vorgefertigt von Bio-Rad (Criterion™). 10 - 15 µL einer Probe wurde in eine Tasche eines 15er Gels aufgetragen. Die Proben wurden zunächst für 5 min bei 120 V im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 160 V bis zum Austritt der blauen Front am Ende des Gels aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenmarker (Tabelle 2.3) auf das Gel geladen um ein Abschätzen der Größe der Proteine zu ermöglichen. Um das SDS zu entfernen wurden die Gele zunächst mit Wasser gewaschen, bevor sie mit Instant Blue (Expedeon) angefärbt wurden. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 2.27 aufgeführt.

Tabelle 2.26: Zusammensetzung von SDS-Gelen (reicht für 8 Gele)

| Lösungen | Trenngel | | Sammelgel | |
|-----------------------------------|----------|---------|-----------|--------|
| | 12 % | 10 % | 5 % | 3 % |
| Acrylamid/Bisacrylamid 30 % (v/v) | 12 ml | 10 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |
| 4× lower buffer | 7,5 ml | 7,5 ml | - | - |
| 4× upper buffer | - | - | 2,5 ml | 2,5 ml |
| 10 % SDS | 0,3 ml | 0,3 ml | - | - |
| H ₂ O | 10,1 ml | 12,4 ml | 5,9 ml | 6,4 ml |
| TEMED (Katalysator) | 40 µl | 40 µl | 30 µl | 30 µl |
| 40 % Ammoniumpersulfat (APS) | 60 µl | 60 µl | 30 µl | 30 µl |

Tabelle 2.27: SDS-PAGE Puffer und Reagenzien

| Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------|--|
| 4× Upper buffer | 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4 % SDS (v/v) |
| 4× Lower buffer | 1.08 M Tris-base, 0.42 M Tris-HCl, pH 8.8 |
| SDS Laufpuffer | 3 g/L Tris-base, 14.4 g/L Glycin, 1 g/L SDS, pH 8.3 |
| 8x SDS Ladebuffer | 7 % SDS (v/v), 0,22 % Glycerol (v/v), 9,6 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,4 mM β -Mercaptoethanol, 0,22 mg/mL Bromphenolblau |

2.8.2 Westernblot und Immunfärbung

Für die spezifische Detektion von Proteinen wurden Westernblots angefertigt. Hierfür wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in Folge eines Elektrotransfers auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) unter Verwendung eines Semi-Dry Blotters übertragen (Kyhse-Andersen, 1984). Die PVDF-Membran wurde im Vorfeld 5 Sekunden in Methanol inkubiert, um die Hydrophobie der Membran zu mindern und einen Kontakt mit dem Transferpuffer zu gewährleisten. Für eine erfolgreiche Proteinübertragung wurde das SDS-Gel, zwei gelgroße Stücke Whatman Papier und die PVDF-Membran für 15 min in Transferpuffer äquilibriert, bevor diese auf der Anode des Blotting-Apparates blasenfrei angeordnet wurden. Auf eine Schicht Whatman-Papier wurde die PVDF-Membran aufgelegt und mit dem SDS-Gel überlagert bis schließlich eine weitere Schicht Whatman-Papier folgte. Die Proteinübertragung wurde je nach Molekülmasse und verwendetem Programm für 5 -10 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 5 % Blockierlösung (Milch-pulver mit TBS-T) schwenkend inkubiert. Im Anschluss wurde 3 x mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen. Für die Immundetektion erfolgte eine Inkubation mit Primärantikörper (über Nacht bei 4 °C) oder mit direkt-gekoppelten Antikörper, meist gegen den His-Tag eines Proteins gerichtet (2 h, RT). Bei Verwendung eines Primärantikörpers wurde die Membran erneut 3 x mit TBS-T gewaschen und mit einem sekundären Antikörper für weitere 2 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (2x mit TBS-T und 1x mit AP-Puffer) wurde der PE-gekoppelte Antikörper mit dem BCIP/NBT Color Development Substrate von Promega detektiert. Die verwendeten Puffer, Reagenzien und Antikörper sind in Tabelle 2.28 aufgeführt.

Tabelle 2.28: Puffer und Reagenzien für Western Blot

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------|--|
| Transferpuffer | 25 mM Tris-base, 192 mM Glycin, 15 % Methanol, pH 8 |
| TBS-T | 20 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween, pH 8 |
| AP-Puffer | 100 mM Tris 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9.5 |

| Reagenzien | Konzentration | Hersteller |
|------------|--|------------|
| NBT | 50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid | Promega |
| BCIP | 50 mg/mL NBT in 70% Dimethylformamid | Promega |

| Antikörper | Typ | Konzentration | Hersteller |
|------------------------------------|----------|---------------|------------|
| Anti His (C-term) AP-Antikörper | direkt | 1:2000 | Invitrogen |
| Mouse- α -His | primär | 1:2000 | Novagen |
| Goat- α -mouse IgG (H+L)-AP | sekundär | 1:7500 | Promega |

2.8.3 MALDI-TOF

Bei der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI-TOF) Massenspektrometrie wird die zu analysierende Proteinprobe (Analyt) mit einer bei der verwendeten Laserwellenlänge stark absorbierenden Matrix (organische Säure z. B. Sinapinsäure) in einem Verhältnis 1:5000 (mol/mol) auf einem Probenhalter kristallisiert. Kurze repetitive hochenergetische Laserpulse führen an der Oberfläche des Kristalls zu einer explosionsartigen Teilchenablösung (siehe Abbildung 2-3). Die freigesetzten Analyt-Ionen werden in die Gasphase überführt und in Abhängigkeit von ihrer relativen Molekularmasse (m/z) auf eine spezifische Geschwindigkeit beschleunigt. Die beschleunigten Ionen benötigen anschließend eine charakteristische Zeit, um einen feldfreien Analysator zu durchlaufen. Die Flugzeit der Ionen wird an einem Detektor registriert, wodurch Rückschlüsse auf die Masse geschlossen werden können, da diese proportional zur Flugzeit ist.

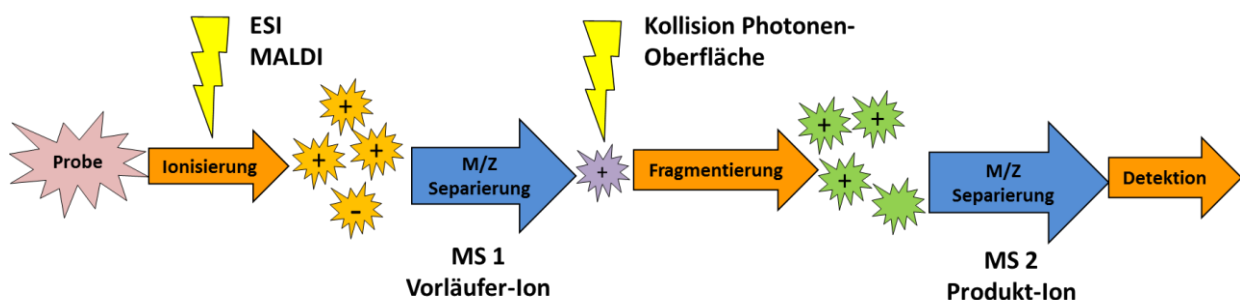


Abbildung 2-3: Prinzipieller Ablauf der Massenspektrometrie.

Für die Identifizierung von Proteinfragmenten aus SDS-Gelen und für die Untersuchung der N-Glykosylierungen rekombinant exprimierter Proteine der HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen wurde MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time-Of-Flight) Massenspektrometrie (MS) verwendet und

von Dr. Manfred Nimtz und der Arbeitsgruppe Zelluläre Proteomforschung des HZI, wie unten beschrieben, durchgeführt.

Die zu analysierenden Proteinbanden wurden zunächst aus dem gefärbten SDS-Gel herausgeschnitten und mehrfach mit Wasser gespült um Salzurückstände zu entfernen. Nach Entfärbung, Reduzierung und Alkylierung wurden die Proben mit 2 ng/μl Trypsin (Promega Corp.) in 50 mmol/l Ammoniumbicarbonat bei 37 °C über Nacht verdaut. Die generierten Peptide wurden extrahiert und mit C18 reversed-phased ZipTips (Millipore) gereinigt. MALDI-TOF wurde mit einem Bruker Ultraflex TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH, Germany) durchgeführt. Für die auf Nanoelektrospray-Ionisierung basierte Tandem Quadrupol-Massenspektrometrie (ESI-QqTOF MS/MS) wurde das Q-TOF-II Massenspektrometer (Waters Corp, Micromass) verwendet um Peptidfragmentierungen zu erhalten. Die generierten Daten wurden mit Hilfe der Software-Programme FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonik GmbH) und dem PepSeq Programm der Software MassLynx™ (Waters Corporation) ausgewertet. Schließlich wurden die erhaltenen Massedaten des nachzuweisenden Proteins mit den theoretischen Peptidmassen der Datenbank MASCOT 2.1.0 (Matrix Science) verglichen. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet, um die beste Übereinstimmung zu finden und das Protein identifizieren zu können.

Für die Bestimmung der Vollmasse des nativen Proteins H1 aus HEK293-6E Wildtypzellen und HEK293-6E MGAT1 k.o. Zellen wurde durch Verwendung der Vivaspin 2 Puffer gegen Reinstwasser (MilliQ) ausgetauscht und das Protein auf 60 pmol/μl konzentriert.

3. Ergebnisse

3.1 Generation neuer RMCE CHO Lec3.2.8.1 Masterzellen

Die in diesem Kapitel beschriebene Zelllinienentwicklung beruht auf dem Flp/FRT Rekombinationssystem von *Saccaromyces cerevisiae*. Ziel dieser Arbeit war es eine neuartige verbesserte CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzelllinie zu entwickeln und damit das bereits vorhandene RMCE-System von Wilke *et al.* (2011) in der Arbeitsgruppe Rekombinante Proteinexpression (RPEX, HZI) für die Produktion und Kristallisation von Glykoproteinen zu verbessern. Ausgangspunkt war die Etablierung verschiedener Produzentenzellen im Rahmen von Kooperationsprojekten (Daten nicht gezeigt) basierend auf der vorhandenen Masterzelllinie SMT_dneo(2)_24 von Sonja Wilke (HZI). Hierdurch sollte einerseits die Handhabung des bestehenden Systems erlernt werden und andererseits sollten Ideen entwickelt werden, um den RMCE-Prozess zur Generierung von Produzentenzellen robuster und vorhersagbarer zu gestalten.

Die bestehende Masterzelllinie SMT_dneo(2)_24 verfügt über ein stabil im Genom integriertes GFP-Markergen, das durch zwei heterospezifische FRT-Sequenzen (FRT₃ und FRT_{WT}) flankiert ist, welche nicht in der Lage sind miteinander zu rekombinieren. In Anwesenheit einer zweiten mit identischen FRT-Sequenzen flankierten DNA-Sequenz findet ein durch die Rekombinase Flippase gesteuerter Kassettenaustausch statt. Der Tagging-Vektor pEF-FS-eGFP-dneo enthält das ATG-defiziente Amino-glykosidase-phosphotransferasegen (Δ neoR) stromabwärts von der FRT-Kassette, welches als Selektionsfalle dient. Das Δ neoR-Gen wird infolge des Kassetten-austauschs komplementiert, wodurch die Zellen resistent gegenüber Geneticin (G418) werden. Der stromaufwärts der FRT-Kassette befindliche EF-1 α Promotor dient als Promotorfalle, d.h. nur durch gerichtete Genintegration eines promotor-losen Transgens, welches durch den Targeting-Vektor infolge des RMCE eingebracht wird, findet eine Genexpression statt.

Die Anwendung des Systems zeigte, dass trotz Antibiotika-Selektion mit G418 nach Austausch der Genkassette weiterhin GFP-positive und demnach nicht ausgetauschte Zellen überlebten. Aufgrund dessen waren neben der Antibiotika-Selektion teilweise mehrere Runden serieller Verdünnungen im 96-Well-Format notwendig um positive Produzentenzellen isolieren zu können. Darüber hinaus waren weitere Untersuchungsmethoden wie etwa die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Durchflusszytometrie erforderlich, um die Klonalität der Produzentenzellen nachzuweisen und „Verunreinigungen“ durch GFP-exprimierende Zellen auszuschließen. Der Selektionsprozess zur Gewinnung von Produzentenzellen stellte sich demnach als zeit- und arbeitsintensiver heraus als vorgesehen und nahm unter Umständen bis zu 3 Monate in Anspruch. Ein Überblick über die Generierung von Produzentenzellen

basierend auf der SMT_dneo(2)_24 RMCE-Masterzelllinie ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

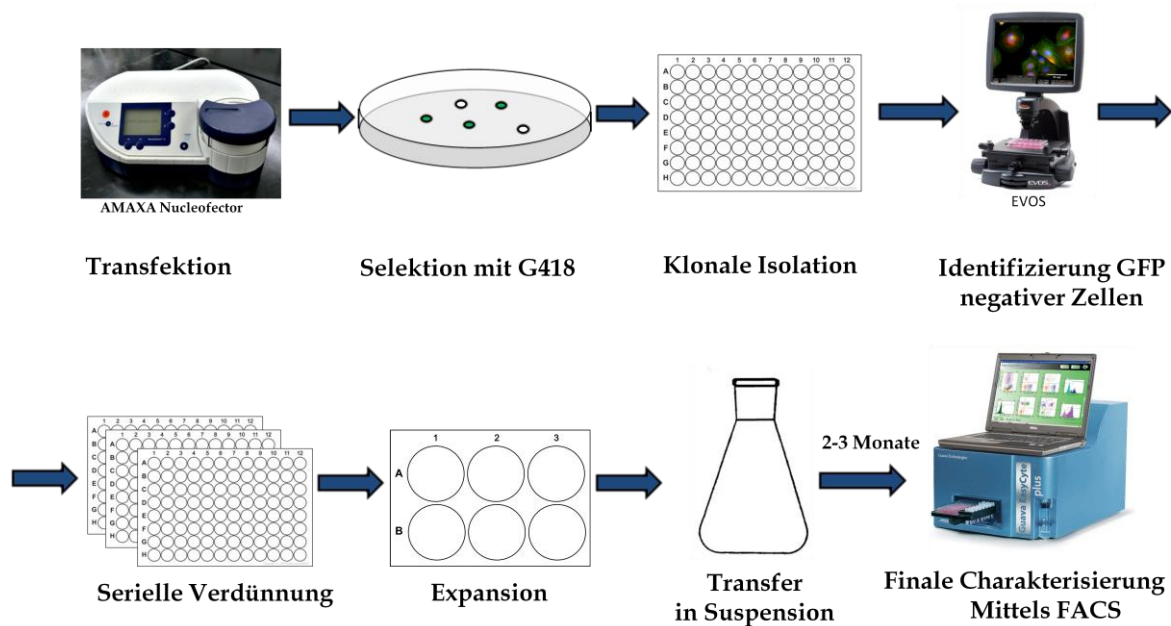


Abbildung 3-1: Ablauf der Generierung von Produzentenzellen auf Grundlage der bestehenden Masterzelllinie SMT-dneo(2)_24. 24 h nach der Kotretransfektion (AMAXA Nucleofector) der Masterzellen mit dem Targeting-Vektor, welcher das GOI trägt, und den Flippase-kodierenden Vektor, werden die Zellen in adhärenzte Kultur überführt. 5 Tage später erfolgt durch die Zugabe von G418 (2mg/ml) eine Selektion für 1-2 Wochen. Die wachsenden Zellklone werden auf GFP-Expression mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops (Evos) untersucht. GFP-negative Zellklone werden gepickt und in mehreren Runden serieller Verdünnungen vereinzelt. Dies kann mehrere Wochen in Anspruch nehmen. Die Zellen werden immer wieder mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht, um auszuschließen, dass sich unter den Produzentenzellen weiterhin GFP-positive Zellen befinden. Anschließend erfolgt eine schrittweise Expansion und die Überführung in Suspensionskultur, bevor die Produzentenzellen mittels Durchflusszytometrie final analysiert werden. Der Prozess von der Masterzelle bis zur Produzentenzelle dauert in der Regel 2 - 3 Monate.

Um die Robustheit des Systems zu verbessern und den Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Generierung der Produzentenzellen zu verringern wurde ein neuer verbesserter Tagging-Vektor kloniert, der die Limitierungen des bestehenden Systems aufheben sollte. Da nach dem Rekombinase gesteuerten Kassettenaustausch auch GFP-exprimierende Masterzellen den Selektionsprozess trotz hoher Mengen an G418 überlebten, wurde zunächst das Δ neoR-Gen gegen ein ATG-defizientes Puromycin-Resistenzgen (Δ Puro) ersetzt. CHO Lec3.2.8.1 Zellen sind nachweislich sensitiver gegenüber Puromycin, wodurch einerseits geringere Antibiotikakonzentrationen notwendig sind und andererseits die Selektion wesentlich stringenter verläuft (siehe Doktorarbeit Bahar Baser, HZI). Um nach der Austauschreaktion die Möglichkeit der Doppelselektion zu besitzen, wurde in den neuen Tagging-Vektor zusätzlich ein Gen zur Negativselektion integriert, das virale Thymidinkinasegen (Tk). Dieses lag als Teil des Fusionsgens HTG vor, welches neben der Tk auch das Reportergen GFP und

das Resistenzgen Hygromycinphosphotransferase enthält. Die Anwesenheit der Thymidinkinase in den Masterzellen führt nach Zugabe des Guanin-Analogons Ganciclovir (GCV) zur Umwandlung in das für die Zelle toxische GCV-Triphosphat, welches nach Einbau in die DNA zu einem Abbruch der DNA-Replikation oder zum Einzelstrangbruch führt (Moolten, 1986), wodurch final ein Zellsterben der Masterzellen verursacht wird. Diese Art der Doppelselektion gewährleistet, dass nur positiv ausgetauschte Zellen überleben, da diese sowohl resistent gegenüber Puromycin als auch Ganciclovir sind.

Anstelle des EF1 α -Promotors wurde für den neuen Tagging-Vektor der virale SV40 Promotor verwendet, da es sich dabei um einen starken Promotor handelt (Lin *et al.*, 1994; James *et al.*, 2000). Dadurch sollte neben einer Verbesserung des Selektionsprozesses zusätzlich eine höhere Produktivität und daraus resultierend eine höhere Produktausbeute der generierten Produzentenzellen erreicht werden.

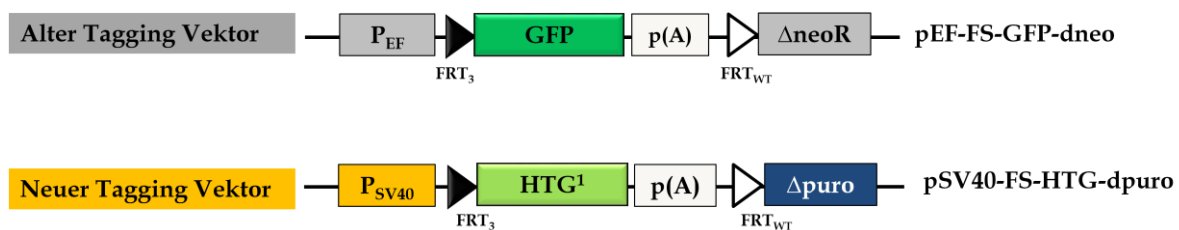


Abbildung 3-2: Schematische Übersicht des alten und neuen Tagging-Vektors. Der neue Tagging-Vektor weist drei wesentliche Unterschiede auf: Er enthält einen stärkeren viralen Promotor (SV40) für eine erhöhte Proteinausbeute, das Fusionsgen HTG, bestehend aus Hygromycinphosphotransferase, Thymidinkinase, welches für die Negativselektion nicht ausgetauschter Zellen genutzt werden soll und GFP, sowie einer sensitiveren Antibiotika-Selektionsfalle (Δ puro).

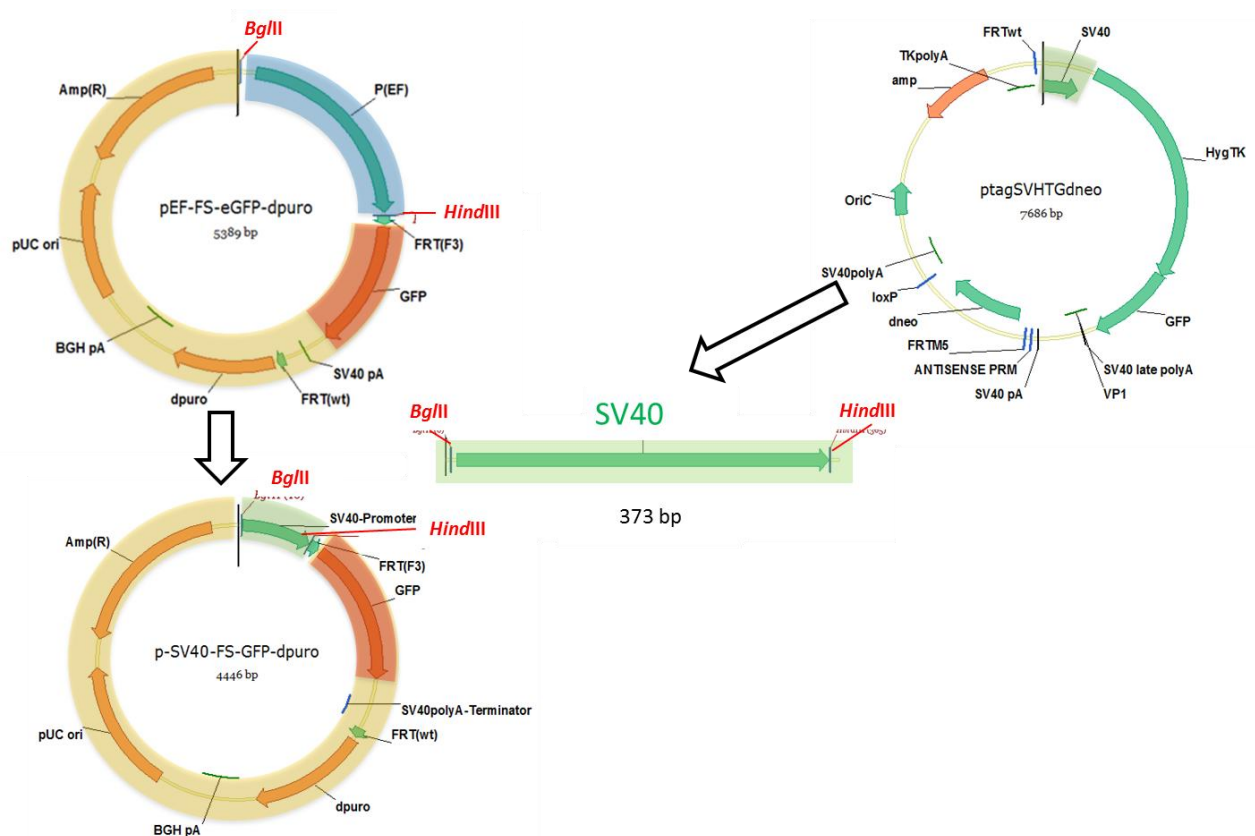
3.2 Klonierung des neuen Tagging- Vektors pSV40-FS-HTG-dpuro

Um die Robustheit des Systems zur Etablierung von Produzentenzellen basierend auf den RMCE zu erhöhen musste eine neue verbesserte Generation von Masterzellen generiert werden. Hierfür war zunächst die Klonierung eines neuen Tagging-Vektors notwendig.

Bei dem Vektor pEF-FS-eGFP-dpuro (Konrad Büssow, HZI) handelt es sich um eine Variante des Vektors pEF-FS-eGFP-dneo, welcher als Tagging-Vektor der CHO Lec3.2.8.1 Zelllinie genutzt wurde und zur Generierung der beiden Masterzelllinien SMT_dneo(2)_24 und der SWI3_26 (Wilke *et al.*, 2011) diente. Der Vektor pEF-FS-eGFP-dpuro enthält bereits das Puromycin-Resistenzgen Δ puro und die beiden heterospezifischen FRT-Sequenzen FRT_{wt} und FRT_3 und diente deshalb als Ausgangsvektor für die Klonierung des neuen Tagging-Vektors. Die Klonierung des pSV40-FS-HTG-dpuro Vektors wurde in drei Schritten durchgeführt. Zunächst

wurde der EF1 α -Promotor gegen den viralen SV40-Promotor, welcher aus dem Vektor ptagSVHTGneo stammte, ausgetauscht. Hierfür wurde dieser mit spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Für eine spätere Integration in den pEF-FS-eGFP-dpuro Vektor wurden die Primer mit den Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BglIII* versehen. Das 373 bp große PCR-Produkt (SV40-Promotor) sowie der Ausgangsvektor pEF-FS-eGFP-dpuro wurden mit den Endonukleasen *HindIII* und *BglIII* verdaut. Das SV40-Fragment wurde in das entstehende Vektorrückrat durch Ligation integriert. Der hierdurch entstehende Vektor pSV40-FS-eGFP-dpuro war Ausgangspunkt für den zweiten Klonierungsschritt. Hier wurde durch spezifische Primer der gesamte Vektor amplifiziert mit Ausnahme des eGFP-Gens. Dabei wurden spezielle Restriktionsschnittstellen (*NheI* und *NotI*) eingefügt, um im dritten Schritt das durch PCR amplifizierte Fusionsgen HTG aus dem Vektor ptagSVHTGneo anstelle des eGFP-Gens zwischen die beiden heterospezifischen FRT-Sequenzen zu klonieren. Dafür wurde das 2930 bp große HTG-PCR Fragment mit denselben Endonuklease-Schnittstellen (*NotI*; *NheI*) ausgestattet um eine Ligation in den mit *NotI* und *NheI* verdauten Vektor zu ligieren. Dadurch konnte der neue Tagging-Vektor pSV40-FS-HTG-dpuro hergestellt werden.

Schritt 1:



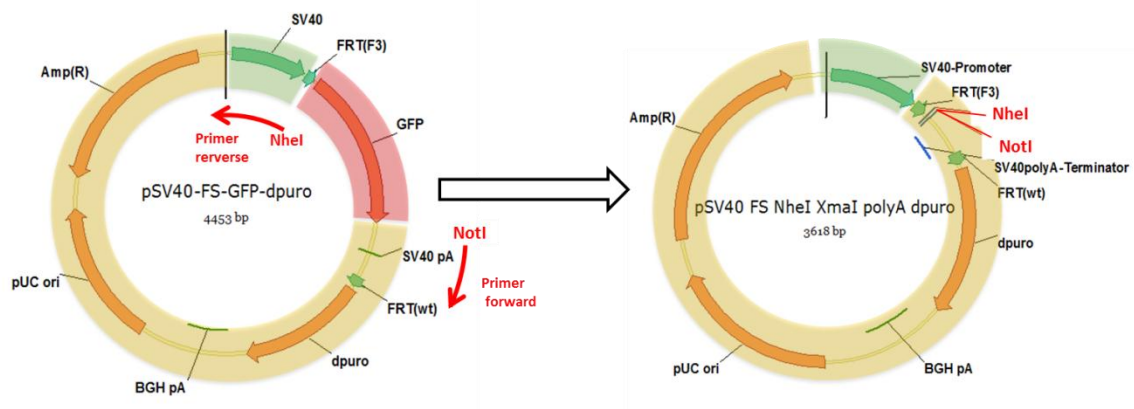
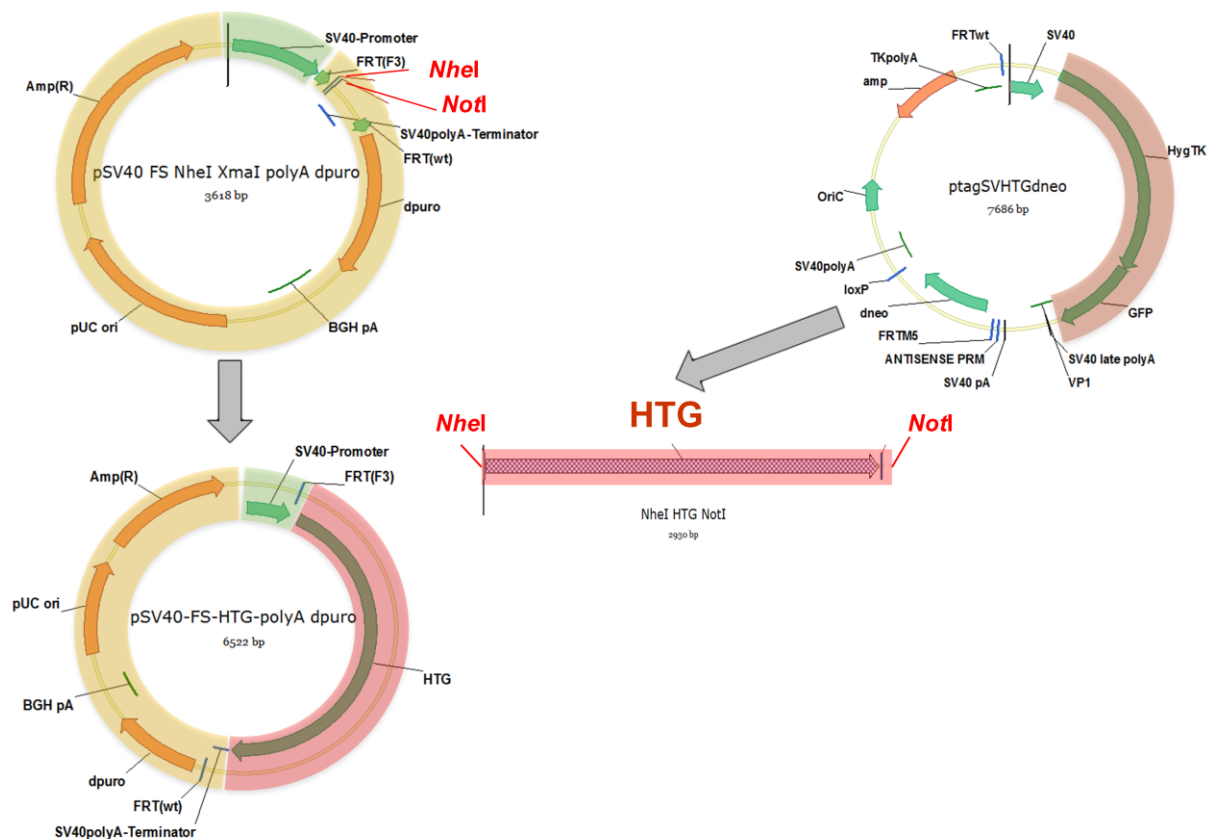
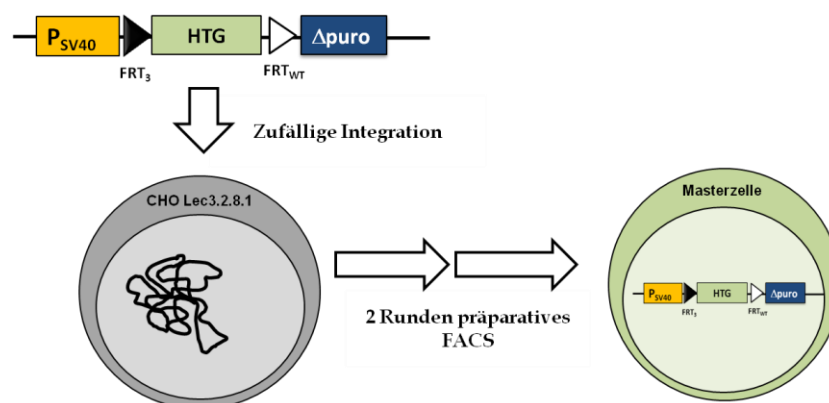
Schritt 2:**Schritt 3:**

Abbildung 3-3: Klonierung des neuen Tagging-Vektors pSV40-HTG-dpuro. Schritt 1: PCR Amplifikation des SV40-Promotors aus ptagSVHTGneo und Anfügen spezifischer Restriktionsschnittstellen (BglIII und HindIII) für die spätere Integration in den Vektor pEF-FS-GFP-dpuro. Dieser wurde zuvor mit BglIII und HindIII verdaut um den EF1 α -Promotor zu entfernen. Im 2. Schritt wurde der gesamte Vektor pSV40-FS-GFP-dpuro mittels PCR amplifiziert, mit Ausnahme des GFP-Gens. Durch das Anfügen spezifischer Restriktionsschnittstellen (NheI; NotI) sowohl bei dem Vektorrückrat (_SV40-FS_dpuro_) als auch bei dem durch PCR amplifizierten HTG-Gen (aus ptagSVHTGneo), konnte durch Restriktionsverdau mit den entsprechenden Endonukleasen NheI und NotI und anschließender Ligation die Generierung des neuen Tagging-Vektors pSV40-FS-HTG-dpuro erfolgen.

3.3 Generierung der neuen CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzelllinie

Zur Generierung der neuen verbesserten Masterzelllinie wurden die CHO Lec3.2.8.1 Zellen zunächst mit 2 µg des Tagging-Vektors pSV40-FS-HTG-dpuro unter Verwendung des Nucleofector™ Systems von AMAXA transfiziert (siehe 2.6.7). 24 h nach der Transfektion folgte eine Selektion mit Hygromycin B (500 µg/ml) um die Transgenintegration in das Genom zu erhöhen. Die transfizierten und selektierten Zellen wurden für ~ 3 Wochen kultiviert, bevor in einer 1. FACS Sortierung (BD Aria) eine Isolation der GFP-positiven Zellen erfolgte, welche den Tagging-Vektor stabil in ihrem Genom integriert hatten (siehe Abbildung 3-4). Die Zellen wurden durch den Sortierungsschritt jedoch so stark beansprucht, dass die Überlebensrate bei der Re-Analyse nur etwa 6 % betrug. Der isolierte Zellpool musste demnach für weitere vier Wochen kultiviert werden bis eine ausreichend hohe Zellzahl für einen weiteren Sortierungsschritt zur Verfügung stand. Nur 66 % der Zellen wiesen daraufhin eine GFP-Expression auf. In einem 2. Sortierungsschritt wurden nun 5% der am höchsten GFP exprimierenden Zellen isoliert. Hierdurch sollte erreicht werden, dass vorzugsweise die Zellen sortiert wurden, welche das Transgen stabil in chromosomalen Bereichen des Genoms integriert hatten, die eine hohe Transkriptionsrate gewährleisten (sogenannte „Hot Spots“). Um die Wiederfindungsrate nach der Zellsortierung zu erhöhen, wurden die Zellen dieses Mal nicht wie anfänglich in Medium, sondern in PBS mit 2 % FCS und 1 % Pluronic sortiert. Somit konnte die Überlebensrate auf ~50 % erhöht werden, was einer 8-fachen Steigerung durch die Verwendung der speziell hergestellten Sortierlösung entspricht.



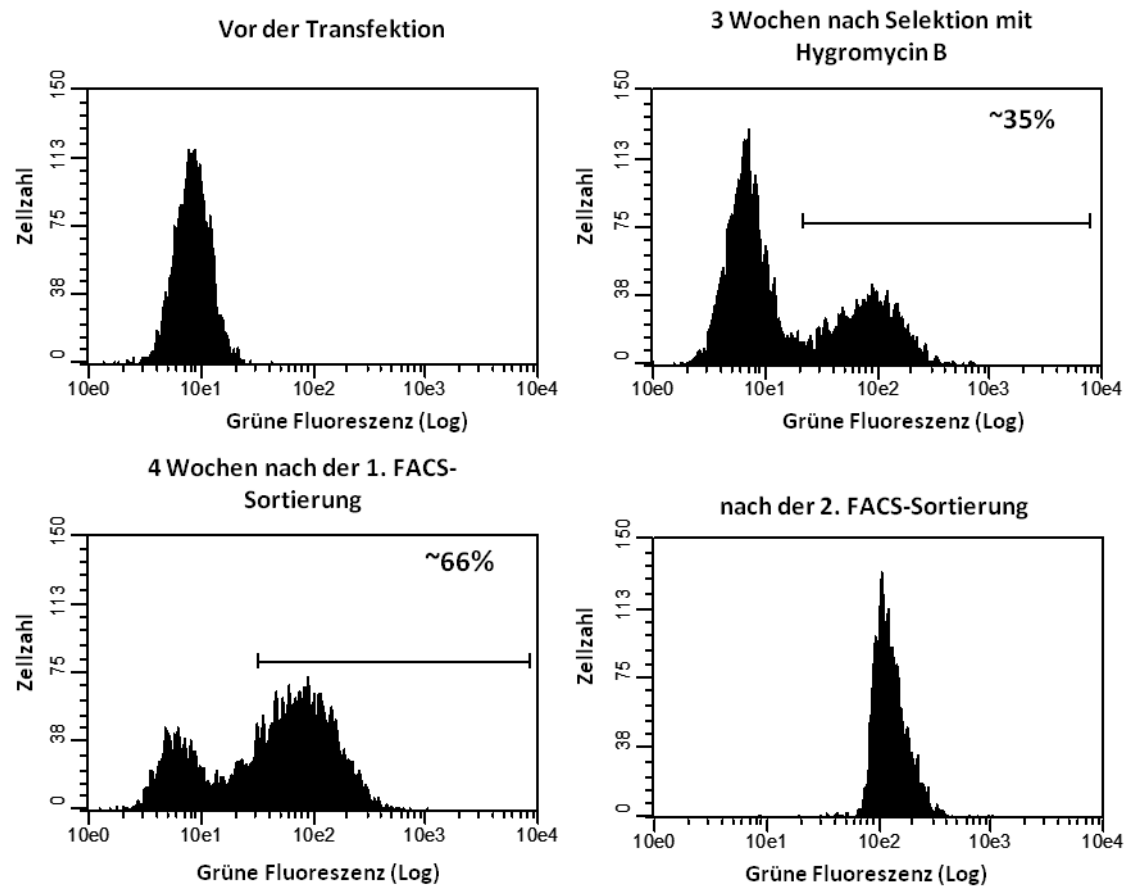


Abbildung 3-4: Generierung der CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzellen. Dargestellt sind die FACS-Diagramme der (un)-transfizierten und sortierten CHO Lec3.2.8.1 Zellen. Die CHO Lec3.2.8.1 Zellen wurden mit dem Tagging-Vektor pSV40-FS-HTG-dpuro transfiziert (Nukleofektion, AMAXA). Nach 48 h erfolgte die Zugabe von 500 µg/ml Hygromycin B. Die Zellen wurden 3 Wochen unter Selektionsdruck expandiert, wobei 35% GFP exprimierende Zellen resultierten. Diese wurde während einer 1. FACS-Sortierung als Pool isoliert. Dieser Zellpool wurde für weitere 4 Wochen kultiviert, bevor eine 2. FACS-Sortierung stattfand.

3.4 Test auf Langzeitstabilität

Eines der wichtigsten Kriterien bei der Generierung von Produzentenzellen ist die Langzeitstabilität der Transgenexpression. Hierfür wurden die potentiellen Masterzellen für 3 - 4 Monate kultiviert und wöchentlich auf GFP-Expression mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zellklone mit stabiler GFP-Expression und guten Wachstumseigenschaften konnten erst durch die kontinuierliche Zugabe von Hygromycin B gewonnen werden. Ohne die Kultivierung unter Selektionsdruck verloren die Zellen mit der Zeit ihre GFP-Expression, welche jedoch durch die erneute Zugabe von Antibiotikum reaktiviert werden konnte. In Abbildung 3-5 sind die Ergebnisse der Langzeitkultivierung der generierten Masterzellen über einen Zeitraum von 4 Monaten dargestellt. Überlappende Fluoreszenz-Kurven weisen die stabile GFP-Expression nach.

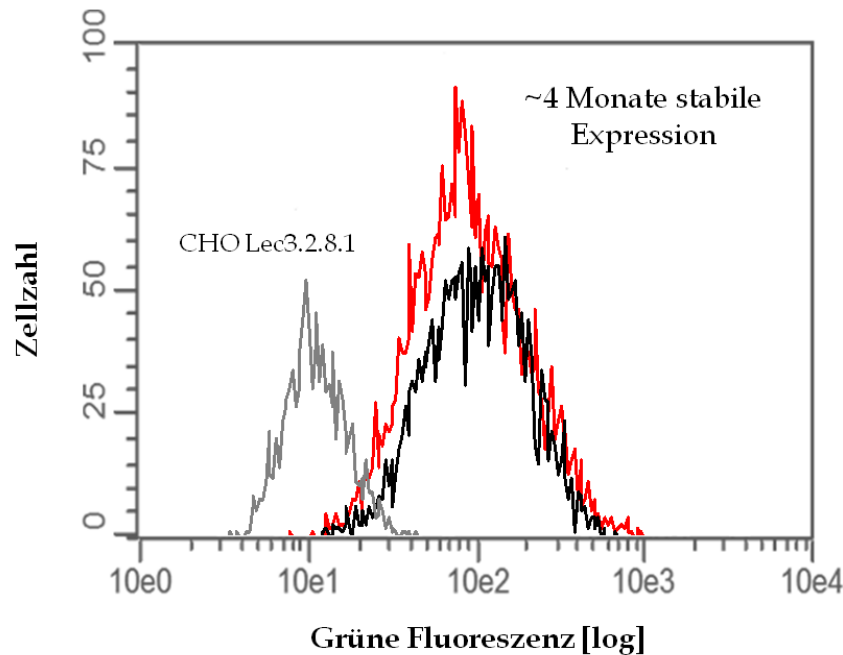


Abbildung 3-5: Test auf Langzeitstabilität der generierten Masterzellen. Die generierten Masterzellen wurden für 4 Monate auf GFP-Expression mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt ist die GFP-Expression der neu generierten Masterzelllinie zwei Wochen nach der 2. FACS-Sortierung (rote Linie) und 4 Monate nach der Kultivierung unter Selektionsdruck mit Hygromycin B (schwarze Linie). CHO Lec3.2.8.1 dienten als Negativkontrolle (graue Linie).

3.5 Überprüfung der Integrität der Tagging-Kassette

Nachdem die generierten Masterzellen infolge der beiden FACS-Sortierungen isoliert und auf Langzeitstabilität überprüft worden waren, erfolgte die klonale Vereinzelung durch *“clone picking”* und serieller Verdünnung. Die isolierten Zellklone wurden expandiert und auf vollständige Integration der Tagging-Kassette mit Hilfe der genomischen PCR untersucht. Hierfür erfolgte zunächst die Extraktion der genomischen DNA der vereinzelter Masterzellklone (siehe 2.5.3). Speziell designte Primer wurden verwendet, um die gesamte Tagging-Kassette, einschließlich des SV40-Promotors und der Puromycin-Selektionskassette zu amplifizieren. PCR Fragmente mit einer Größe von 4200 bp bestätigt das Vorhandensein der vollständigen Tagging-Kassette in der chromosomalen DNA des jeweiligen RMCE-Masterzellklons. Als Positivkontrolle diente der Original-Tagging Vektor.

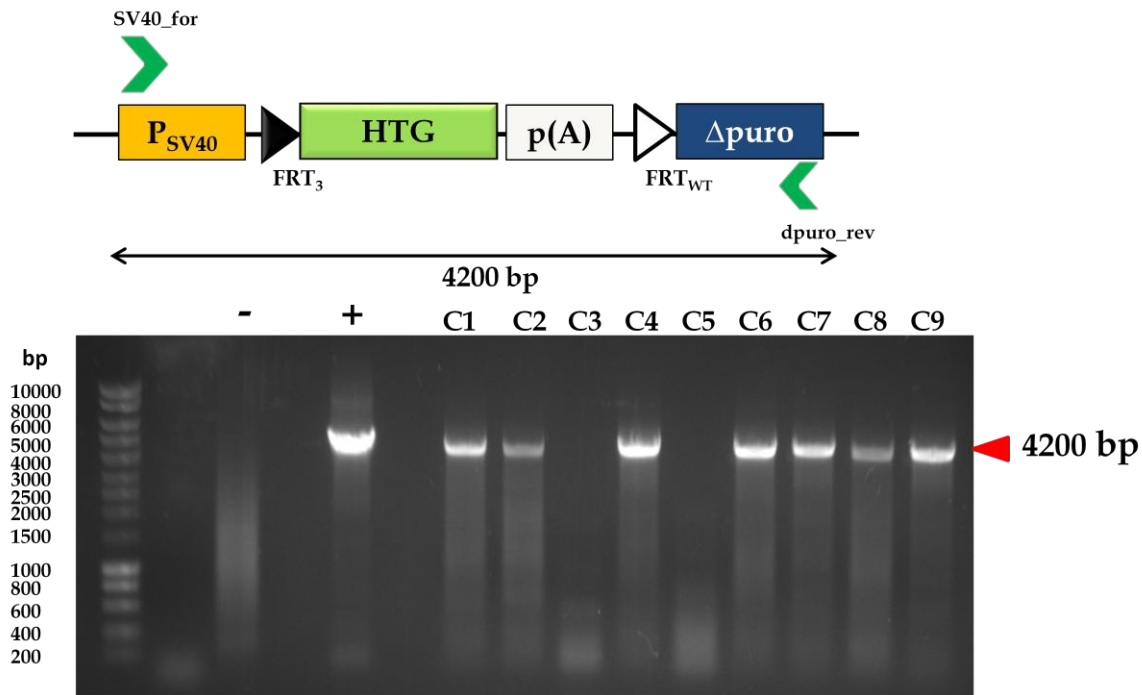


Abbildung 3-6: Nachweis der Integrität des Tagging-Vektors durch genomische PCR. Die isolierten Masterzellklone wurden auf Integration der vollständigen Tagging-Kassette (schematische Übersicht) in ihrem Genom untersucht. Hierfür wurde zunächst die genomische DNA isoliert. Mit spezifischen PCR-Primern (grüne Pfeilspitzen) erfolgte die PCR-Amplifikation der Tagging-Kassette. Der Original Tagging-Vektor diente als Positivkontrolle (+), wobei die genomische DNA der CHO Lec3.2.8.1 Zelllinie als Negativkontrolle (-) verwendet wurde. Ein PCR Amplifikat mit einer Länge von 4200 bp dient als Nachweis der vollständigen Integration der Tagging-Kassette.

3.6 Erhöhung der RMCE vermittelten Austauscheffizienz

Ziel dieser Arbeit war es die Robustheit des RMCE Systems für die Herstellung von Produzentenzellen zu verbessern. Für diesen Zweck wurde neben der Generierung einer neuen RMCE-Masterzelllinie mit optimierten Eigenschaften ebenfalls versucht die Austauscheffizienz infolge des gerichteten Kassettenaustausches zu erhöhen.

Um das gewünschte Zielgen, welches das zu produzierende rekombinante Protein kodiert, in den stabil integrierten Austauschlokus zu integrieren, müssen zunächst die dafür notwendigen Vektoren (Targeting-Vektor, FlpO-Helferplasmid) kotransfiziert werden. Hierfür wurde bislang die Nucleofector™ Technologie von AMAXA genutzt. Es zeigte sich jedoch, dass die Transfektionseffizienz dieser Methode sehr gering ist und auch die Vitalität der Zellen erheblich davon beeinträchtigt wird. In der Bachelorarbeit von Karin Landgraf (RPEX, HZI) wurden verschiedene Transfektionsreagenzien auf ihre Eignung für die transiente Proteinexpression untersucht. Die besten aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse wurden genutzt und als Alternativen zur klassischen Nucleofector™-Technologie getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 dargestellt.

Es wurden die beiden Transfektionsreagenzien PEI und FektoPRO mit der Nucleofector™ Technologie verglichen. Hierfür wurden die CHO Lec3.2.8.1 Masterzellen SMT-dneo(2)_24 mit dem pExchange-tdTomato und dem Flippase kodierenden Vektor kotransfiziert. Die Tdtomato-Expression der transfizierten Zellen wurde nach 24 Stunden und nach 168 h (1 Woche) mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Dabei wurden jeweils 3 biologische Replikate zur Analyse herangezogen. Es zeigte sich, dass die Nucleofector™ Technologie mit Abstand die schlechteste Transfektionseffizienz liefert. Nach einer Woche wiesen nur ~ 2% der Zellen eine rote Fluoreszenz auf und exprimierten demnach stabil das Gen tdTomato. PEI hingegen eignet sich deutlich besser als Transfektionsreagenz, da hier nach einer Woche ~20 % der transfizierten Zellen Tdtomato-positiv waren. FektoPRO erzielte 24 Stunden nach der Transfektion die höchsten Transfektionseffizienzen von über 40 %, wobei hier nach einer Woche noch etwa 25 % der Zellen Tdtomato exprimierten. Eine hohe Transfektionseffizienz korreliert demnach direkt proportional mit der RMCE vermittelten Austauschrate.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Nucleofector™ Technologie keinesfalls als Transfektionsmethode für die Generierung von Produzentenzellen infolge des RMCE eignet. Es sollte stattdessen auf die deutlich effizienteren Transfektionsmethoden mit den chemischen Reagenzien PEI oder FektoPRO zurückgegriffen werden. Da FektoPRO verglichen zu PEI noch ein wenig bessere Ergebnisse erzielte, wurde in dieser Arbeit für weitere RMCE-Versuche nur noch FektoPRO als Transfektionsreagenz verwendet.

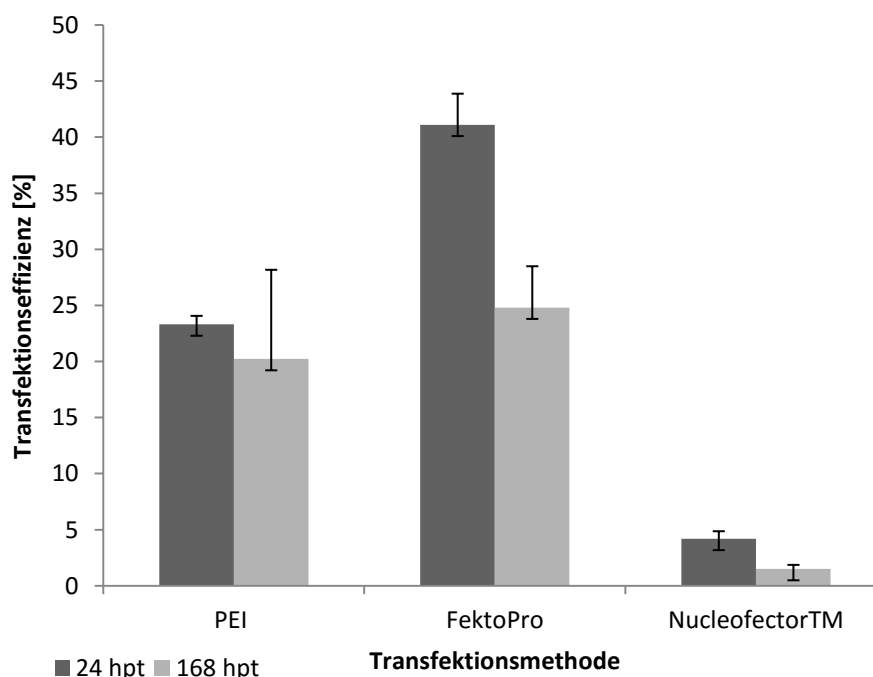


Abbildung 3-7: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden für den RMCE (Nucleofector™, PEI und FektoPRO). Bislang wurde die Nucleofector™ Technologie (AMAXA) verwendet, um den

Targeting-Vektor (GOI) und den Helferplasmid (FlpO) in die RMCE-Masterzellen für die Generierung der Produzentenzellen einzubringen. Es zeigte sich jedoch eine sehr geringe Transfektionseffizienz von 5%. Nach einer Woche exprimierten nur noch 2% der Zelle stabil das GOI (tdTomato). Als Alternativen wurden die chemischen Transfektionsreagenzien PEI und FektoPRO getestet, welche deutlich bessere Transfektionseffizienzen erzielten (>20-40 %, 24hpt). ~25 % der transfizierten Zellen wiesen nach einer Woche eine stabile tdTomato-Expression auf, was zeigt, dass eine hohe Transfektionseffizienz zu einer erhöhten Austauschrate infolge des gerichteten Kassettenaustauschs beiträgt.

3.7 Nachweis der Austauschbarkeit der Tagging-Kassette

Nachdem die neu generierten Masterzellen auf Langzeitstabilität der Transgenexpression und das Vorhandensein der vollständigen Tagging-Kassette überprüft worden waren, erfolgte eine erste Austauschreaktion (RMCE) mit einem Modellprotein. Hierfür wurde tdTomato ausgewählt, da es sich aufgrund seiner roten Fluoreszenz schnell und einfach analysieren lässt (Fluoreszenz-Mikroskop, Durchflusszytometer).

Um sicherzustellen, dass es sich bei der gemessenen tdTomato-Expression tatsächlich um ein Austauschereignis handelt und die Genkassette nicht zufällig im Genom integriert oder es sich um eine transiente Genexpression handelt, wurde ein Austauschvektor verwendet, dem ein aktiver Promotor fehlt. Normalerweise wird für den RMCE der Multi-Host-Vektor pFlpBtM-II verwendet (Abbildung 1-14). Dieser trägt jedoch stromaufwärts vor dem FRT-flankierten GOI einen CMV-Promotor, welcher eigentlich für die transiente Genexpression in HEK293-6E Zellen genutzt wird, jedoch auch in CHO-Zellen aktiv ist. Dies könnte möglicherweise zu Falschaussagen bezüglich der Austauschbarkeit des Genlokus beitragen.

Daher wurde für den ersten RMCE-Versuch in den neu generierten Masterzellen KKA_SVHTG(2)_1 der pExchange-tdTomato verwendet, eine Variante des pFlpBtM-II, bei dem die Promotorregion deletiert wurde (Johannes Spehr, HZI). TdTomato kann demnach nur exprimiert werden, wenn es zu einer gerichteten Genintegration nach erfolgreichem RMCE stromabwärts des SV40 Promotors kommt (siehe Abbildung 3-8).

Nach Kotransfektion des Targeting-Vektors (pExchange-tdTomato) und des Helferplasmids (FlpO) findet eine durch die Rekombinase Flippase katalysierte Austauschreaktion zwischen den heterospezifischen FRT-Sequenzen (FRT₃ und FRT_{WT}) der Masterzelle und des Donorvektors statt. Nur ein erfolgreicher Kassettenaustausch führt zu einem Verlust der GFP-Expression bei gleichzeitiger Aktivierung des tdTomato-Gens. Darüber hinaus werden die Zellen durch das Einbringen des PGK-Promotors und eines ATG-Startcodons resistent gegenüber Puromycin. 5 Tage nach der Transfektion wurde mit der Selektion durch die Zugabe von 15 µg/ml Puromycin und des Guanin-Analogons Ganciclovir (10 µM) begonnen. Nur die positiv ausgetauschten Produzentenzellen überlebten den doppelten Selektionsprozess.

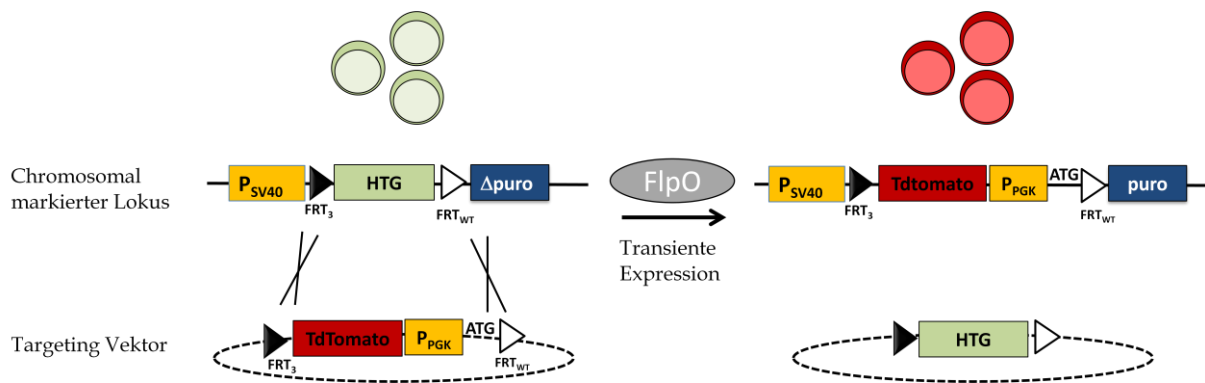


Abbildung 3-8: Schematische Übersicht über den 1. RMCE-Versuch mit dTomato. Zunächst werden der Targeting-Vektor (pExchange-tdTomato) und der Helferplasmid (FlpO) kotransfiziert. Die Flippase katalysiert den gerichteten Kassettenaustausch zwischen dem FRT-flankierten HTG-Gen der Masterzelle und dem tdTomato des Targeting-Vektors, welches mit denselben heterospezifischen FRT-Sequenzen ausgestattet ist. Gleichzeitig wird die Selektionsfalle $\Delta puro$ durch das Einbringen des PGK-Promotors und eines ATG-Startcodons aktiviert. Die resultierende Produzentenzelllinie ist nach dem erfolgreichen Kassettenaustausch resistent gegenüber Puromycin. Darüber hinaus können alle nicht-ausgetauschten Zellen zusätzlich zu Puromycin durch die Zugabe von Ganciclovir beseitigt werden, so dass sichergestellt wird, dass nur noch positive Produzentenzellen den Selektionsprozess überleben.

Um die Robustheit der neu generierten RMCE-Masterzelllinie mit der bereits vorhandenen Masterzelllinie vergleichen zu können, wurde der zuvor beschriebene RMCE-Versuch parallel mit der SMT_deno(2)_24 Masterzelllinie durchgeführt. Hier wurde wie bereits unter 2.6.9 beschrieben vorgegangen. 14 Tage nach der Selektion mit den entsprechenden Antibiotika (G418 bzw. Puromycin und Ganciclovir) wurde die Stringenz der Doppelselektion bei der KKA_SVHTG(2)_1 Masterzelllinie deutlich (siehe Abbildung 3-10). Es waren nur noch tdTomato exprimierende Zellen vorhanden. Bei der SMT_dneo(2)_24 Zelllinie waren neben positiv ausgetauschten Zellen weiterhin GFP exprimierende Zellen zu erkennen. Dieses Phänomen ist auf die unzureichende Sensitivität gegenüber G418 zurückzuführen. Interessant ist auch, dass neben roten und grünen Zellklonen auch gelbe Zellen vorhanden waren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Zellpopulation sowohl GFP als auch tdTomato exprimierte.

Desweiteren wurde die Expressionsstärke in Bezug auf tdTomato zwischen den beiden Masterzelllinien SMT_dneo(2)_24 und KKA_SVHTG(2)_1 verglichen (Abbildung 3-9). Dabei wird deutlich, dass mit beiden Zelllinien ähnliche Expressionslevel erreicht werden konnten. Anders als angenommen, trug der stärkere SV40-Promotor des neuen Tagging-Vektors nicht zu einer Erhöhung der Produktausbeute bei. Vielmehr weist der EF1 α -Promotor eine etwas höhere tdTomato-Expression auf.

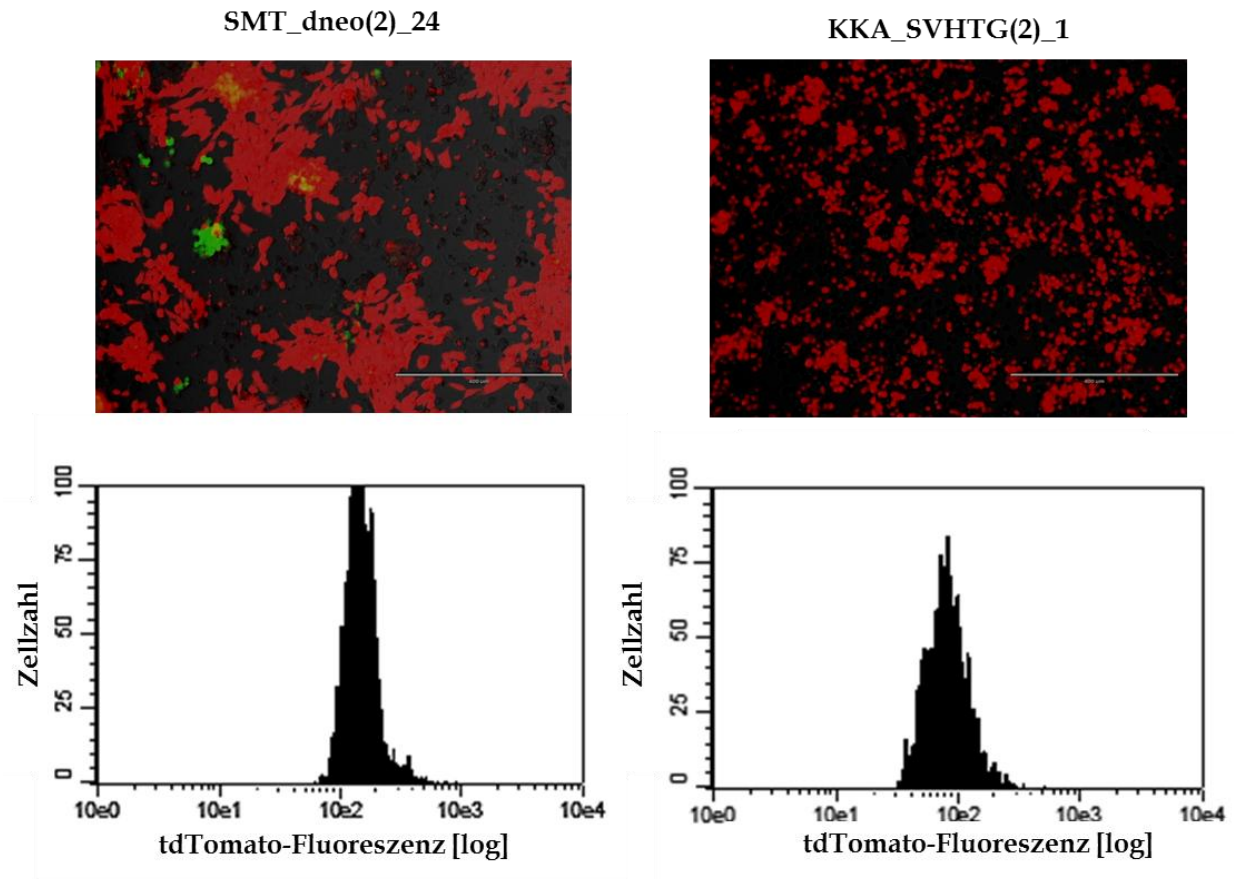


Abbildung 3-9: Ergebnisse des RMCE mit pExchange-tdTomato bei den Masterzelllinien SMT_dneo(2)_24 und KKA_SVHTG(2)_1 nach Antibiotikaselektion. Dargestellt sind sowohl Bilder der Fluoreszenz-Mikroskopie als auch Daten der Durchflusszytometrie.

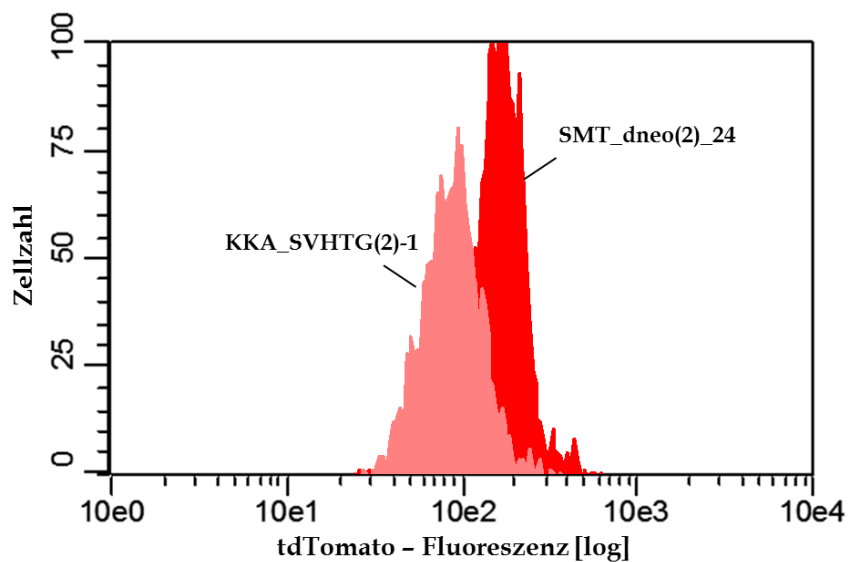


Abbildung 3-10: Vergleich der Expressionsstärke von tdTomato der beiden Masterzelllinien SMT_dneo(2)_24 und KKA_SVHTG(2)_1 (Overlay).

3.8 Herstellung der HEK293-6E MGAT1 Knockout-Zelllinie

Zur Herstellung der HEK293-6E MGAT1 Knockout-Zelllinie mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie wurden im Vorfeld der Arbeit zwei verschiedene gRNA-Vektoren von GenScript bestellt, welche spezifisch im MGAT1-Lokus binden und ein minimales *off-target* Risiko bezüglich einer Cas9-Aktivität fernab der eigentlichen Zielsequenz besitzen. Diese gRNA-Sequenzen wurden im Labor von Feng Zhang (Broad Institut) designt.

Für einen effizienten Gen Knockout ist normalerweise ein einziges gRNA-Konstrukt ausreichend. Um jedoch die Erfolgschancen zu erhöhen und den Knockout anschließend schnell und einfach mit Hilfe der PCR nachweisen zu können, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene gRNA-Konstrukte verwendet. Die von GenScript gelieferten Vektoren enthalten neben der gRNA-Target Sequenz alle für die Expression und DNA-Bindung notwendigen Elemente: einen U6-Promoter, die gRNA Scaffold-Sequenz und einen Terminator (siehe Abbildung 3-11).

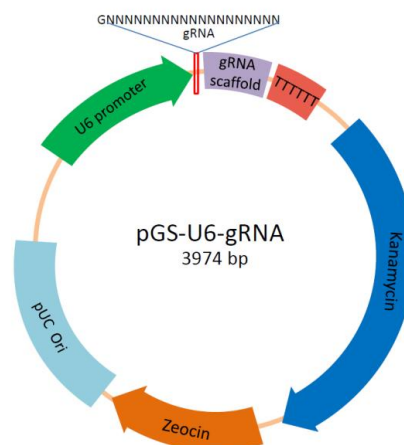


Abbildung 3-11: gRNA-Expressionsvektor (GenScript). Der Vektor enthält alle für die Expression der gRNA notwendigen Elemente: einen U6-Promotor, eine Klonierungsstelle für jede beliebige gRNA, die gRNA Scaffold-Sequenz und einen Terminator.

Für die Cas9 Expression wurde der pSpCas9 BB-2A-GFP (PX458) Vektor verwendet (siehe Abbildung 3-12). Dieser wurde ursprünglich vom Feng Zhang Lab entwickelt und enthält neben dem für den Menschen Codon-optimierten Cas9-Gen ebenfalls eine NLS-Sequenz für den gerichteten Cas9-Transport in den Zellkern. Für eine einfache Visualisierung der Cas9-Expression wurde Cas9 mit eGFP fusioniert. Der PX458 kann auch für die Insertion der zu verwendeten gRNA-Sequenz genutzt werden, wodurch nur ein einziger Vektor für die gerichtete Genmutation notwendig wäre. Da in dieser Arbeit jedoch zwei verschiedene gRNAs für eine erhöhte Erfolgsgarantie des MGAT1-Knockouts und Vereinfachung der nachfolgenden

Validierung der Genmutation zum Einsatz kamen, blieb diese Vektorfunktion ungenutzt.

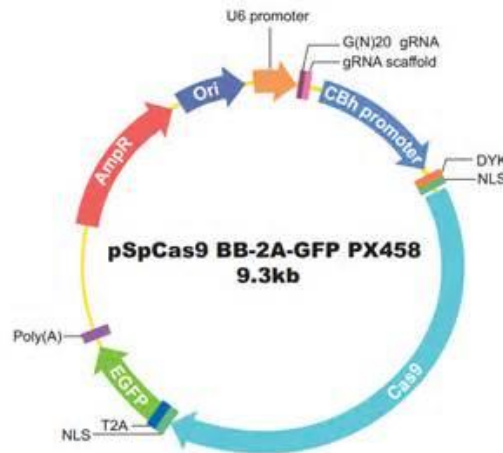


Abbildung 3-12: Cas9-Expressionsvektor (PX458). Es handelt sich um einen bicistronischen Vektor, welcher das für den Menschen Codon-optimierte Cas9 aus *S. pyogenes* (SpCas9) kodiert, sowie ein 3' stromabwärts befindliches eGFP-Gen. Beide Gene sind über das selbst schneidende Peptid 2A verbunden und verfügen jeweils über eine eigene NLS-Sequenz für den erforderlichen Kerntransport.

Die transfizierten Zellen müssen nicht aufwändig vereinzelt (z.B. durch Antibiotika-Selektion wie bei PX459 pSp(BB)-2A-puro) und auf Cas9-Aktivität überprüft werden, sondern können direkt mit Hilfe der Durchflusszytometrie isoliert werden.

In Abbildung 3-13 ist ein Überblick über den Ablauf der Generierung des CRISPR/Cas9 induzierten MGAT1-Knockouts dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung kann im Kapitel 2.6.8 nachgelesen werden.

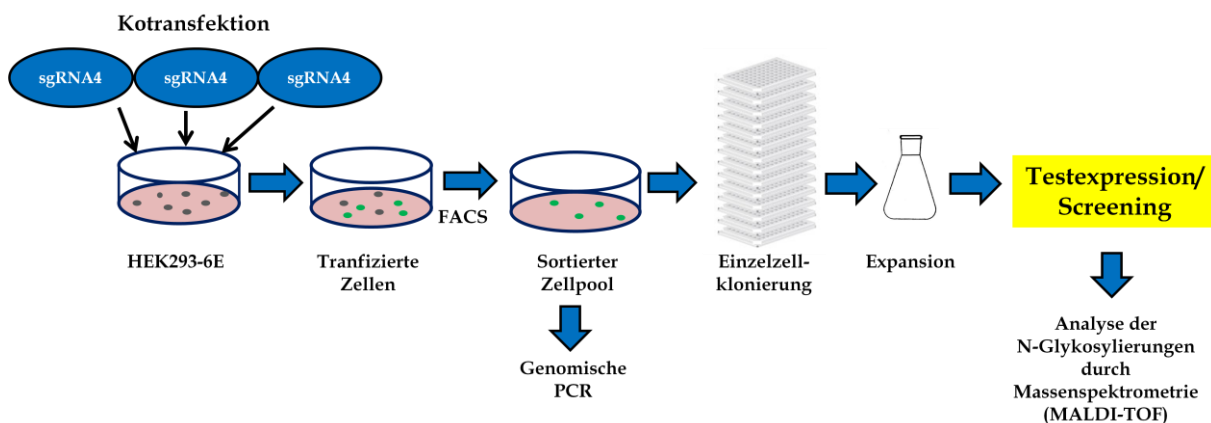


Abbildung 3-13: Übersicht Generierung HEK293-6E MGAT1 Knockout-Zelllinie. HEK293-6E Zellen werden in adhärenthes Wachstum überführt und am nächsten Tag mit den beiden gRNA-Expressionsvektoren (gRNA4, gRNA6) und dem Cas9-exprimierenden Vektor pSpCas9 BB-2A-GFP (PX458) kotransfiziert. Nach 24 Stunden erfolgt die FACS-Isolation der GFP positiven Zellen. Der sortierte Zellpool wird durch genomische PCR auf erfolgreiche Genmutation überprüft. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Einzelzellklonierung, Expansion der Klone und die erneute Überführung in Suspensionskultur. Die generierte Zelllinie wird durch Testexpression eines Glykoproteins und massenspektrometrische Untersuchungen weiter charakterisiert.

Einen Tag nach Kotransfektion wurden die HEK293-6E Zellen mit dem Aria-II nach GFP exprimierenden Zellen sortiert (Lothar Gröbe, HZI). Dabei waren 16 % der Gesamtpopulation GFP-positiv und wurden in zwei Wells einer 48-Wellplatte überführt. Die FACS-Ergebnisse sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

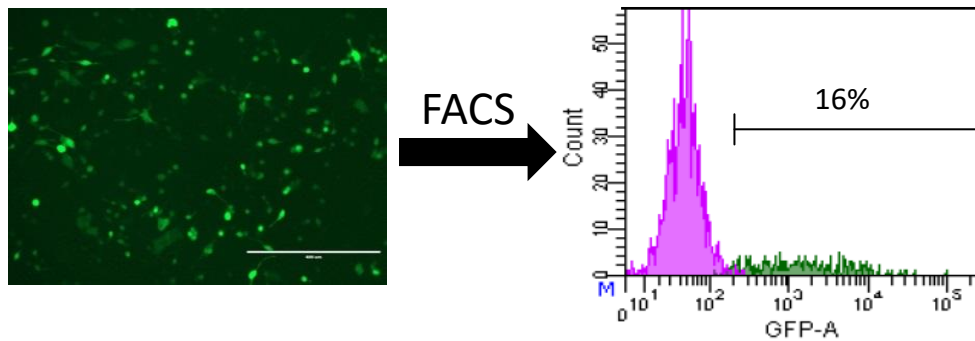


Abbildung 3-14: HEK293-6E Zellen 24 h nach Kotransfektion von gRNAs und Cas9-Vektor. Einen Tag nach der Kotransfektion von gRNA4, gRNA6 und Cas9-Vektor wurden die HEK293-6E Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und mit Hilfe des Aria-II auf GFP exprimierende Zellen sortiert. Dabei lag die Transfektionseffizienz bzw. der Anteil GFP-positiver Zellen bei ~16 %.

Die beiden für den MGAT1-Lokus spezifischen sgRNAs von GenScript (gRNA4 grün; gRNA6 blau) wurden verwendet um eine 407 bp lange Deletion im MGAT1-Exon zu erzeugen. Die 20 bp langen Zielsequenzen im MGAT1-Lokus und die vorhergesagte Deletion sind in Abbildung 3-15 A dargestellt. Die Zielsequenz der gRNA4 befindet sich auf dem Sense-Strang, wohingegen die gRNA6 den Antisense-Strang durch komplementäre Basenpaarung bindet. Die jeweiligen PAM-Sequenzen sind entsprechend farblich hervorgehoben (weinrot). Die Nuklease Cas9 induziert einen DNA-Doppelstrangbruch 3 bp stromaufwärts von der PAM-Sequenz (rotes Dreieck), wodurch eine Deletion eines 407 bp großen DNA-Fragments stattfindet.

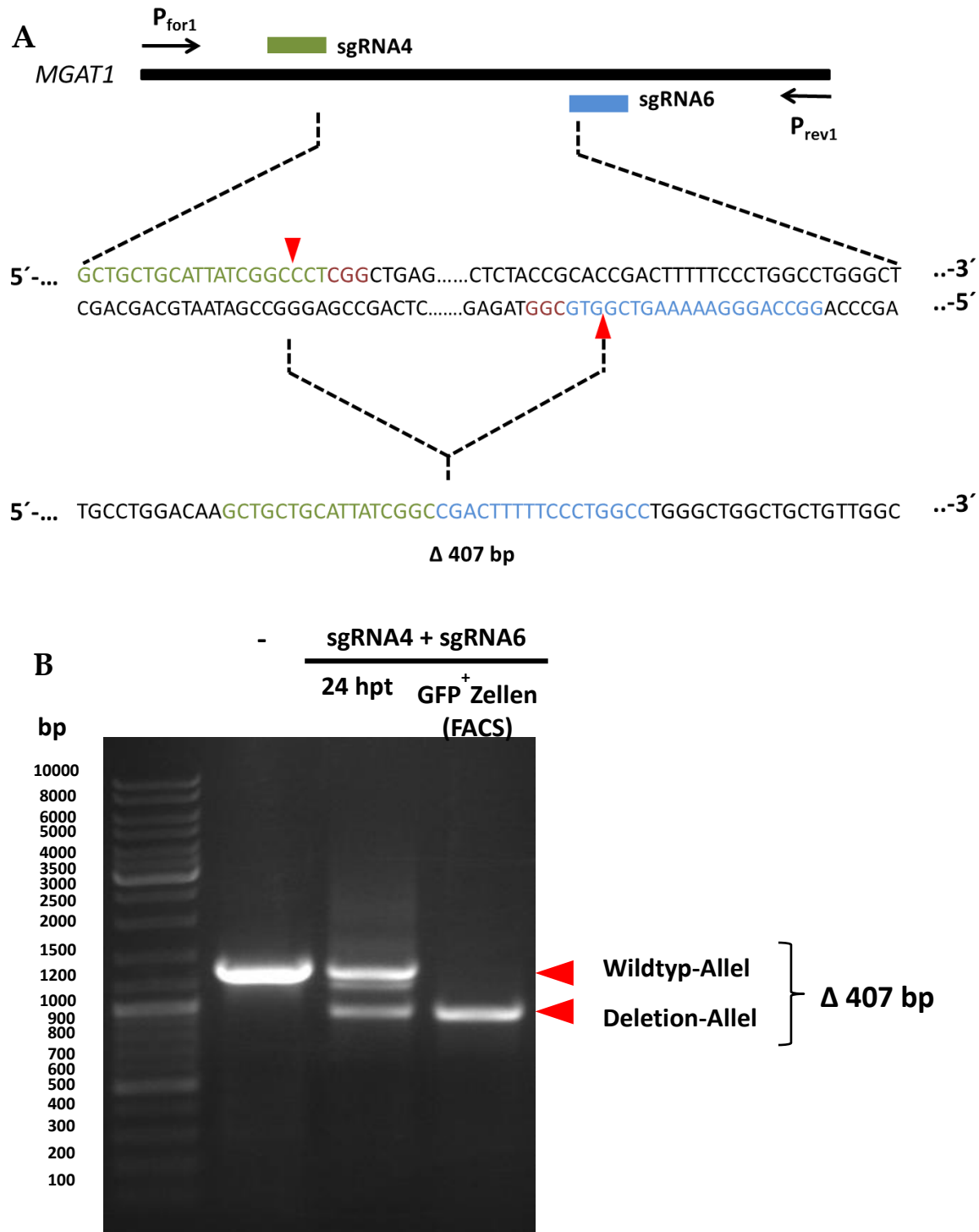


Abbildung 3-15: Ergebnisse der CRISPR/Cas9-vermittelten Deletion im MGAT1-Lokus. **A.** Zwei verschiedene gRNAs (grün und blauer Balken) wurden verwendet um eine Deletion im MGAT1-Gen zu bewirken. Die Zielsequenzen sind in den jeweiligen Farben dargestellt. Die gRNA4 hat ihre Target-Sequenz auf dem Sense-Strang, wohingegen die gRNA6 den Antisense-Strang erkennt. Die PAM-Sequenz ist weinrot hervorgehoben. Die Stellen an denen Cas9 den DNA-Doppelstrangbruch katalysiert sind durch rote Pfeilspitzen markiert. Die vorhergesagte Deletion ist darunter dargestellt. **B.** PCR-Ergebnisse der isolierten genomischen DNA von unbehandelten HEK293-6E Zellen und mit gRNA4, gRNA6 und Cas9-Vektor kotransfizierten Zellen 24 h nach Transfektion und nach der FACS-Sortierung. Es wurden die Primer MGAT1_for1 und MGAT1_rev1 verwendet (siehe 2.3). Eine Deletion von 407 bp ist vorhanden.

In Abbildung 3-15 B sind die Ergebnisse der genomischen PCR des MGAT1-Lokus von unbehandelten HEK293-6E Zellen und von Zellen, welche mit gRNA4, gRNA6 und Cas9-Vektor kotransfiziert wurden, dargestellt. Dabei erfolgte eine DNA-Isolation 24 h nach der Transfektion und nach erfolgter Zellsortierung nach GFP exprimierenden Zellen. Durch Verwendung spezifischer Primer für den MGAT1-Lokus konnte die genomische DNA auf das Vorhandensein einer Cas9 vermittelten Deletion untersucht werden. Der MGAT1-Lokus weist eine Größe von 1302 bp auf, welcher auch in den unbehandelten HEK293-6E Zellen nachgewiesen werden konnte. Einen Tag nach der Transfektion der beiden gRNAs und des Cas9-Vektors lag eine gemischte Zellpopulation vor. Ein Teil der Zellen verfügte weiterhin über die Wildtyp DNA-Sequenz und ein anderer Teil wies eine um ~400 bp verkürzte MGAT1-Sequenz auf. Dies entspricht der vorhergesagten Deletion von 407 bp.

Um die Klonalität der neu generierten HEK293-6E Zelllinie zu gewährleisten, wurden nach mehrwöchiger Expansion des sortierten Zellpools Einzellklone isoliert (siehe 2.6.10). Diese wurden erneut infolge der genomischen PCR auf bi-allelen Knockout untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-16 dargestellt. In den Klonen 9, 12 und 14 lagen mono-allele Knockouts vor. Klon 5 wies weiterhin die Wildtyp MGAT1 Sequenz auf, wohingegen Klon 3, 4 und 13 einen homozygoten Knockout besaßen.

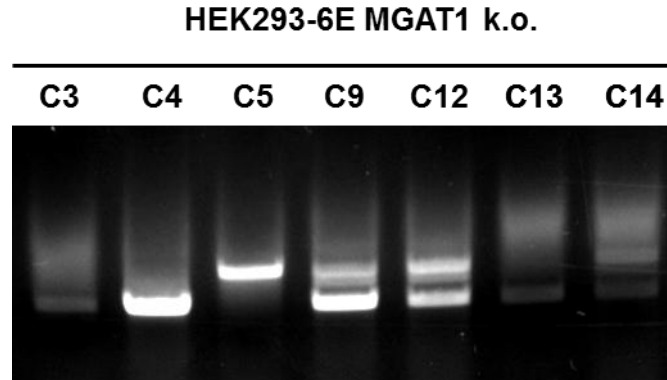


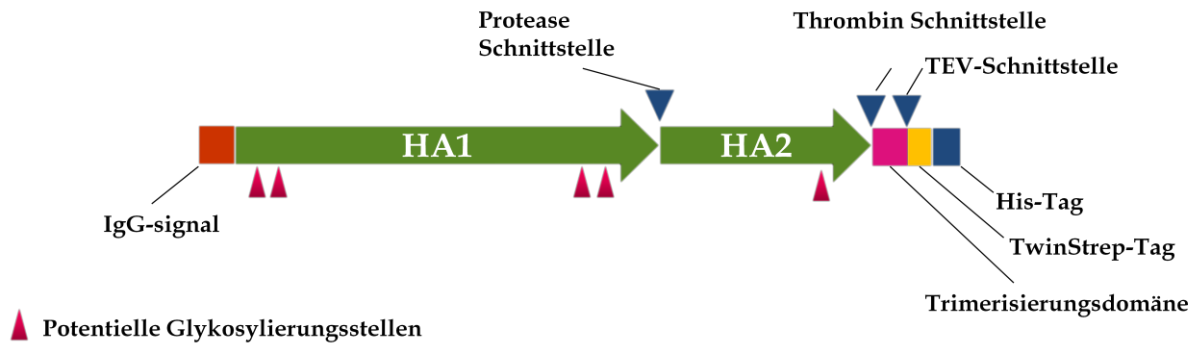
Abbildung 3-16: Überprüfung des bi-allelen Knockouts in den MGAT1 k.o. Zellklonen. Die transfizierten und FACS-sortierten HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen wurden klonal vereinzelt, expandiert und infolge der genomischen PCR genotypisiert. C3, C4 und C13 weisen eine homozygote Deletion auf, wohingegen C9, C12 und C14 nur auf einem Allel eine Gendeletion besaßen.

3.9 Untersuchung der N-Glykosylierungen

Die neu generierte HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie wurde in weiterführenden Experimenten auf veränderte Glykosylierungseigenschaften untersucht. Ausgangspunkt war die Produktion eines Glykoproteins, welches sich gut in HEK293-6E Zellen exprimieren lässt. Eines für die AG RPEX relevantes Protein, welches bereits erfolgreich in *Hi5* Insektenzellen produziert und kristallisiert werden konnte, ist das Hämagglutinin H1 von Influenza A. Dieses wurde in vorangegangenen Experimenten u.a. auch in HEK293-6E Wildtyp Zellen exprimiert, wobei gute Ausbeuten von ~20 mg/L erzielt wurden (Margitta Schürig, HZI). Das Protein war jedoch nicht stabil und aggregierte in Folge der Deglykosylierung über Nacht bei 4 °C.

H1 besitzt 5 potentielle N-Glykosylierungsstellen (siehe Abbildung 3-17). Die MALDI-TOF unterstützte Proteinvollmasse-Bestimmung des in normalen HEK293-6E Zellen produzierten H1 führte zu einem sehr breiten ungleichmäßigen Massepeak (Masse:Ladung-Verhältnis; m/z), was auf eine stark variierende Molekülmasse zurückgeführt werden kann. Ursache hierfür sind die komplexen und heterogenen N-Glykosylierungen auf der Proteinoberfläche, welche i.d.R. auch durch PNGase F Verdau nur unvollständig abgespalten werden können. Für eine erfolgreiche Kristallisation ist das Vorhandensein eines homogenen Glykosylierungsmusters essentiell, da bei zu starker Heterogenität kein stabiler Zustand, der für die Ausbildung eines Proteinkristalls notwendig ist, erreicht werden kann (Stura, Nemerow and Wilson, 1992; Butters *et al.*, 1999; Kwong *et al.*, 1999; Davis and Crispin, 2010).

Ziel des Expressionsversuchs von H1 in der neu generierten HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie war es zunächst Unterschiede in der N-Glykosylierung zwischen Wildtyp und Mutante nachzuweisen. Der generierte Knockout des MGAT1-Gens sollte zu einem vollständigen Enzymverlust von GnT-I beitragen, wodurch exprimierte Glykoproteine nur über N-Glykosylierungen des mannosereichen Typs verfügen.

A**B**

MGWSCIILFLVATATGVHSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAG
 WLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQSSVSFFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHE
 GKSSFYRNLLWLTEKEGSPKLNYSYVNKKGKEVLVLWGIHPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAE
 RPKVRDQAGRMNYYWTLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
 NIHPVTIGCEPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLY
 EKVKSQKLKNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVRSLVPRGSPGSGYIPEAPRD
 GQAYVRKDGEWVLLSTFLVNLVFQGSASWHPQFEKGGSGSGSGSASWHPQFEKLEHHHHHHHH

Abbildung 3-17: Übersicht des verwendeten H1-Konstrukts von Influenza A. **A** Dargestellt sind die HA1 und HA2-Untereinheiten von H1 sowie die für die Sekretion und Aufreinigung notwendigen Signalsequenzen und Protein-Tags. Außerdem sind die potentiellen N-Glykosylierungsstellen durch rosa Pfeilspitzen markiert. **B** Zugrundeliegende Aminosäuresequenz: IgG-Signalsequenz (weinrot), HA1 und HA2-Untereinheit (schwarz), Trimerisierungsdomäne (rosa), TwinStrep-Tag (gelb) und His-Tag (dunkelblau). Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind in der Aminosäuresequenz durch rote Asparagin-Reste (N) hervorgehoben.

Zunächst erfolgte im kleinen Maßstab (25 ml) eine Transfektion der HEK293-6E und der HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie mit dem pFlpBtM-II-H1. Es wurde nach Standardprotokoll 2.6.5.1 verfahren. Alle 24 h erfolgte eine Probenahme um die Transfektionseffizienz zu messen und um Proben des Überstandes für spätere Analysen aufzubewahren. Nach 192 h wurde der Expressionsversuch beendet und der Kulturüberstand geerntet.

In Abbildung 3-18 sind die Ergebnisse der H1-Produktion im SDS-Gel und Westernblot dargestellt. Es wurden Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion aufgetragen (24 hpt – 192 hpt). Dabei wurde entsprechend des Probenahmezeitpunkts jeweils H1 des Wildtyps und der Mutante (HEK293-6E MGAT1 K.o. C4) nebeneinander aufgetragen. Insbesondere im Westernblot kann zu jedem Zeitpunkt nach der Transfektion ein Massenunterschied von H1 bezüglich der Wildtyp und Knockout-Zelllinie verzeichnet werden. Während H1 im Wildtyp einen etwas breiteren Bandenschmear bildet, ist die Bande von H1 aus der Knockout-Zelllinie deutlich schmaler und stringenter. Die Proteinbande läuft auch ein wenig weiter als H1 aus dem Wildtyp, was auf eine signifikant kleinere Proteinmasse zurückzuführen ist.

Aufgrund der Deletion im MGAT1-Lokus in der mutierten Zelllinie ist die N-Acetylglucosaminyltransferase (GnT-I) inaktiv, wodurch nur noch verkürzte N-Glykane des Mannose-reichen Typs prozessiert werden können (siehe auch Abbildung 1-12). Die sich hierdurch ergebenden Proteinmassen sind demnach kleiner als bei Anwesenheit des intakten Proteins. Die schmalen stringenten Proteinbanden bei H1 aus der Mutante ergeben sich aufgrund der homogenen Zusammensetzung der Glykanseitenketten auf der Proteinoberfläche. Im Gegensatz zum Wildtyp tritt bei der Mutante keine Variation der Zuckermolekülreste auf.

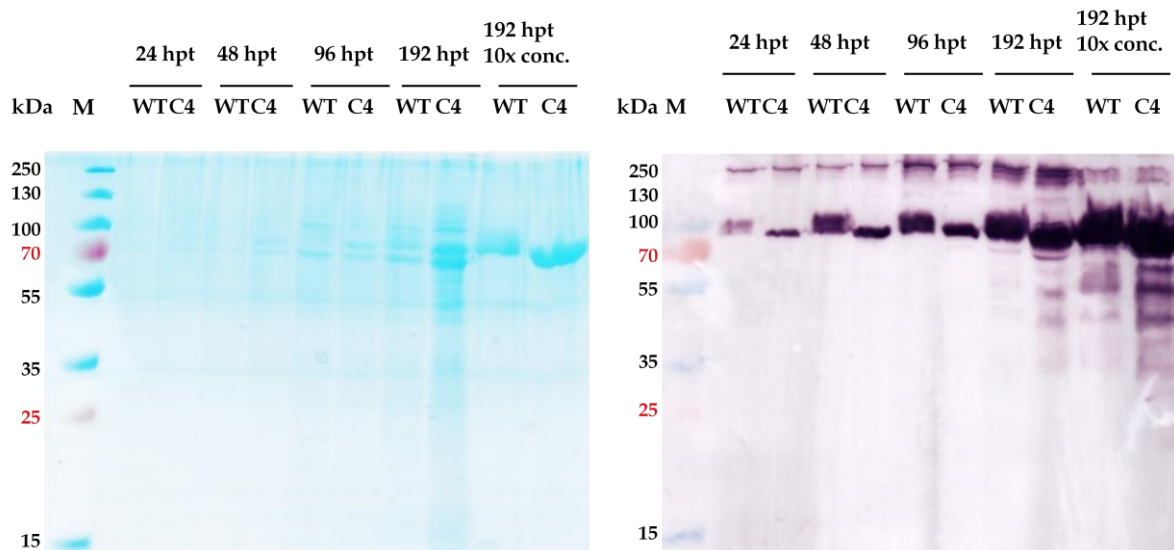


Abbildung 3-18: SDS-Gel und Westernblot der H1-Produktion in HEK293-6E Zellen und MGAT1 K.o. Zellen.

Um den Massenunterschied auch auf SDS-Niveau erkennen zu können, wurde ein Teil des geernteten Kulturüberstands (192 hpt) beider Zelllinien mit Hilfe magnetischer His-Beads aufgereinigt (2.7.3) und 10x konzentriert. Die Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Bestimmung der N-Glykosylierungen an die Abteilung Zelluläre Proteomforschung (HZI) übergeben. Unter Leitung von Dr. Manfred Nimtz wurden die Proben tryptisch verdaut und mit Hilfe von MALDI-TOF und ESI-TOF analysiert (siehe 2.8.3). Gleichzeitig wurde eine Vollmassebestimmung der beiden Proteine durchgeführt um die Ergebnisse des Westernblots validieren zu können (Abbildung 3-19).

Die ermittelte Vollmasse für H1, welches mit Hilfe der HEK293-6E Zellen produziert wurde, beträgt ~74 kDa, wobei die Vollmasse desselben Proteins in der Mutante nur ~72 kDa beträgt. Es ergibt sich demnach ein Massenunterschied von ~ 2000 Da. Betrachtet man das Spektrum beider Proteine fällt weiterhin auf, dass der H1-Peak der Mutante sehr viel schmaler und glatter verläuft, als bei H1 aus dem Wildtyp. Hier ist bei dem Wildtyp eine höhere Varianz der Proteinmasse zu erkennen. Diese

Ergebnisse sind ein weiterer Indiz für die unterschiedlichen Glykosylierungen der beiden Zelllinien. H1 aus den MGAT1-K.o. Zellen weist im Gegensatz zum Wildtyp eine verkürzte und homogene Glykosylierung auf, wodurch sich die Unterschiede in der Proteinmasse und Peakbreite erklären lassen.

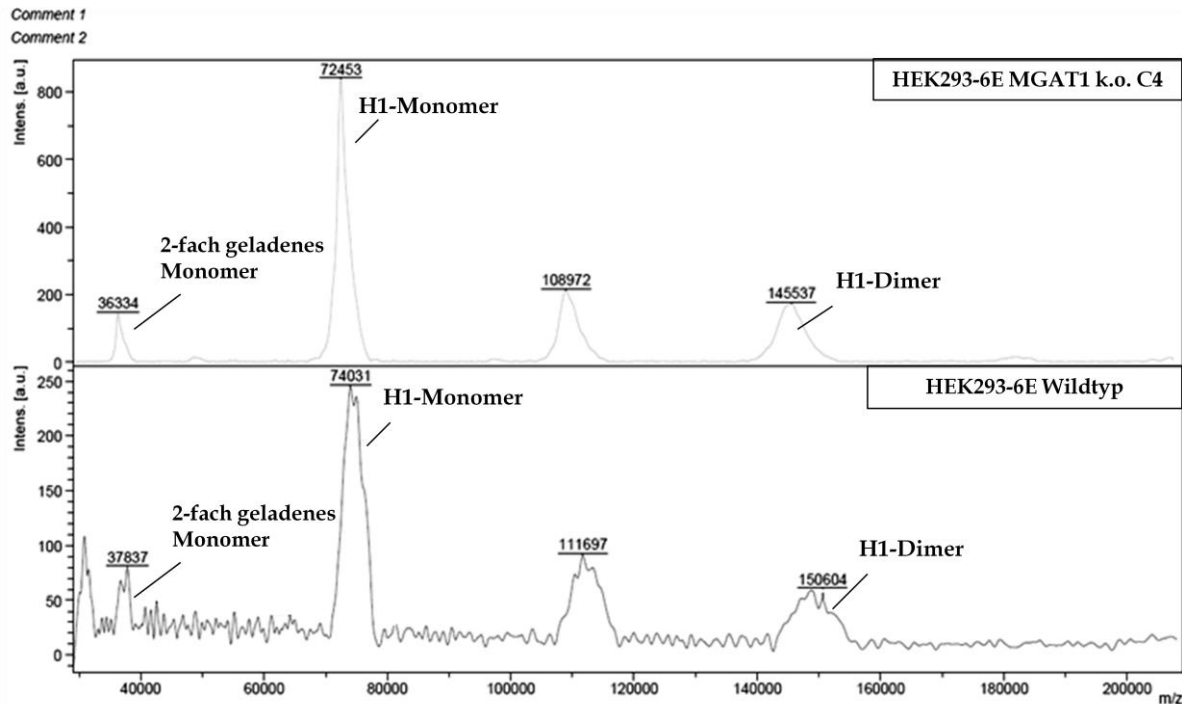


Abbildung 3-19: Vergleich der Vollmasse von H1 aus HEK293-6E Zellen und HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen.

In Abbildung 3-20 sind die Ergebnisse der Elektronenspray Ionisation MSⁿ Massenspektrometrie dargestellt. Die in Folge eines tryptischen Verdaus des aus dem SDS-Gel extrahierten H1 von Wildtyp und Mutante resultierenden Peptide wurden auf ihre N-Glykosylierungen untersucht.

Dabei spaltet Trypsin (Serinprotease) selektiv Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R). In Tabelle 3.1 sind die relevanten Peptide aufgeführt, welche die potentiellen N-Glykosylierungen tragen sowie die theoretischen Massen, die sich aus der Besetzung mit dem Mannose-reichen Glykan-Typ ergeben. Die Peptide sind infolge der Elektronenspray Ionisation MSⁿ Massenspektrometrie (ESI/MS) analysiert worden. Dabei konnte sowohl die Aminosäuresequenz des zugehörigen Glykopeptids als auch die Zusammensetzung der N-Glykosylierung bestimmt werden. Das dargestellte Übersichtsspektrum belegt die Besetzung aller 5 potentiellen N-Glykosylierungsstellen ausschließlich mit dem Mannose-reichen Glykan-Typ. Die Positionen N30, N42, N287, N305 und N499 tragen die charakteristische Struktur der Form GlcNAc₂Man₅, was einer Masse von 1216 Da entspricht. Es konnten insgesamt vier verschiedene Glykopeptide nachgewiesen werden. Bei dem Glykopeptid 20-59 (6875 Da) befindet sich bei Aminosäure 41 eine Trypsinschnittstelle, wodurch zwei Peptide entstehen sollten. Da

es sich bei der benachbarten Aminosäure 42 jedoch um eine Glykosylierungsstelle handelt, ist diese unter Umständen für Trypsin unzugänglich.

Die sich in ergebenden Massenabweichungen sind auf eine Verunreinigung mit Acrylamid zurückzuführen, welches eine Masse von 71 Da besitzt. Ursache hierfür ist die unvollständige Polymerisierung bei der Herstellung des SDS-PAGE Trägermaterials, wodurch es zu einer Alkylierung von Cystein und zur Bildung eines Thioether-Derivats, dem Cys-S-beta-propionamid (Cys-S-Pam) kommt.

M1086A_XT_00001_MHp_#2 RT: 2.000 AV: 1 NL: 9.21E6
T: FTMS + p NSI Full ms [400.00-2000.00]

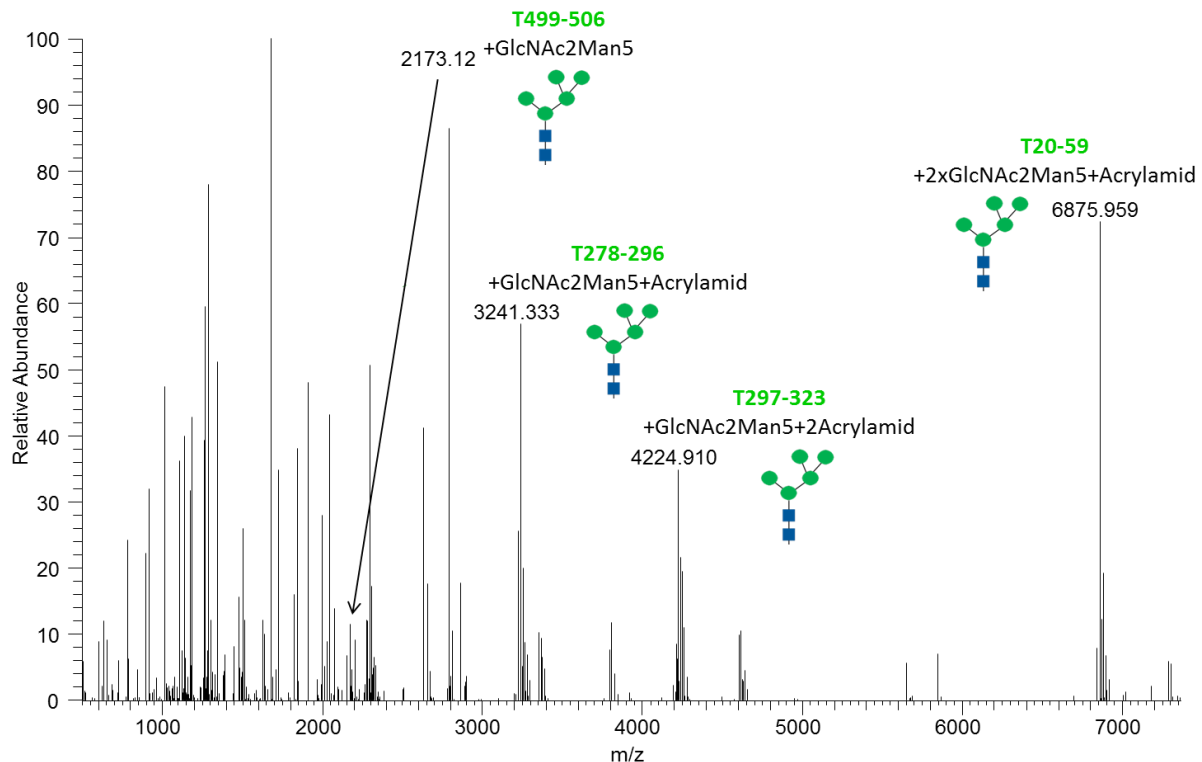
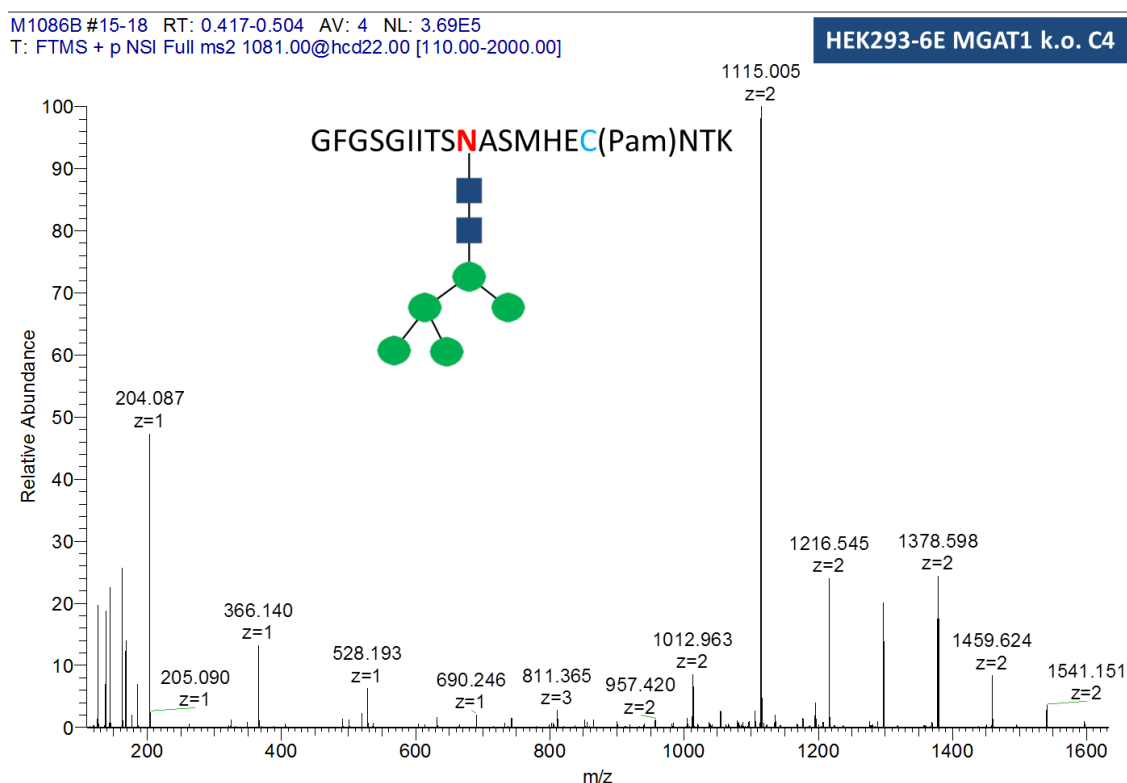


Abbildung 3-20: Massenspektrum der H1-Peptide aus der HEK293-6E MGAT1 k.o. Zelllinie. Die aus dem Trypsin-Verdau von H1 resultierenden Peptide wurden infolge einer ESI Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert. Dabei wurden 4 Glyko-Peptide identifiziert, welche die für den Mannose-reichen Glykantyp charakteristische Struktur der Form GlcNAc2Man5 tragen. Das relativ große Glykopeptid 20-59 mit einer Masse von ~6875 Da weist zwei sehr eng beieinander liegende N-Glykosylierungen auf (N30 und N42), weshalb die vorhergesagte Trypsin-Spaltung bei Aminosäure 41 (http://web.expasy.org/peptide_mass/) sterisch gehemmt ist.

Tabelle 3.1: Peptidmassen und zugehörige Aminosäuresequenzen der H1-Glykopeptide der MGAT1 Mutante. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Peptide, ihre Position im H1-Konstrukt, sowie die ermittelten Peptidmassen, welche durch ESI Tandem Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten. Hervorgehoben ist jeweils der Asparagin-Rest mit der Erkennungssequenz NXS/T/C, welcher die entsprechende N-Glykosylierung trägt. Die Massenabweichungen zu den theoretischen Peptidmassen, sind auf eine Alkylierung von Cystein mit unpolymerisiertem Acrylamid (71 Da) zurückzuführen.

| Ermittelte Peptidmassen | zugehörige Peptidsequenz | Position | Peptidmasse | Theoretische Peptidmasse [+GlcNAc ₂ Man ₅] |
|-------------------------|---|----------|-------------|---|
| 6857,959 | DTICIGYHAN N STDVTVDTVLEK N VTVTHSVNLLED SHNGK | 20-59 | 4372 | 6804 |
| 3241,333 | GFGSGIITS N ASMHEC N TK | 278-296 | 1953 | 3169 |
| 4224,910 | CQTPLGAI N SSLPYQNIHPVTIGEC PK | 297-323 | 2880 | 4096 |
| 2173,223 | N GTYDYPK | 499-506 | 957 | 2173 |

Zum Vergleich der N-Glykosylierungen von Mutante und Wildtyp wurde exemplarisch ein Peptid ausgewählt um den Unterschied in der Glykanstruktur zu verdeutlichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-21 dargestellt. Das Peptid 278-296 weist eine N-Glykosylierung des Mannose-reichen Typs mit der Struktur GlcNAc₂Man₅ auf. Dasselbe Peptid von H1 aus dem Wildtyp trägt hingegen eine Glykan-Struktur, welche dem Komplex-Typ zugeordnet werden kann mit zwei biantennär endständigen GlcNAc-Resten.



A0242B #16-79 RT: 0.325-1.181 AV: 41 NL: 7.80E4
T: FTMS + p NSI Full ms2 1157.5000@hcd26.00 [150.0000-2000.0000]

HEK293-6E Wildtyp

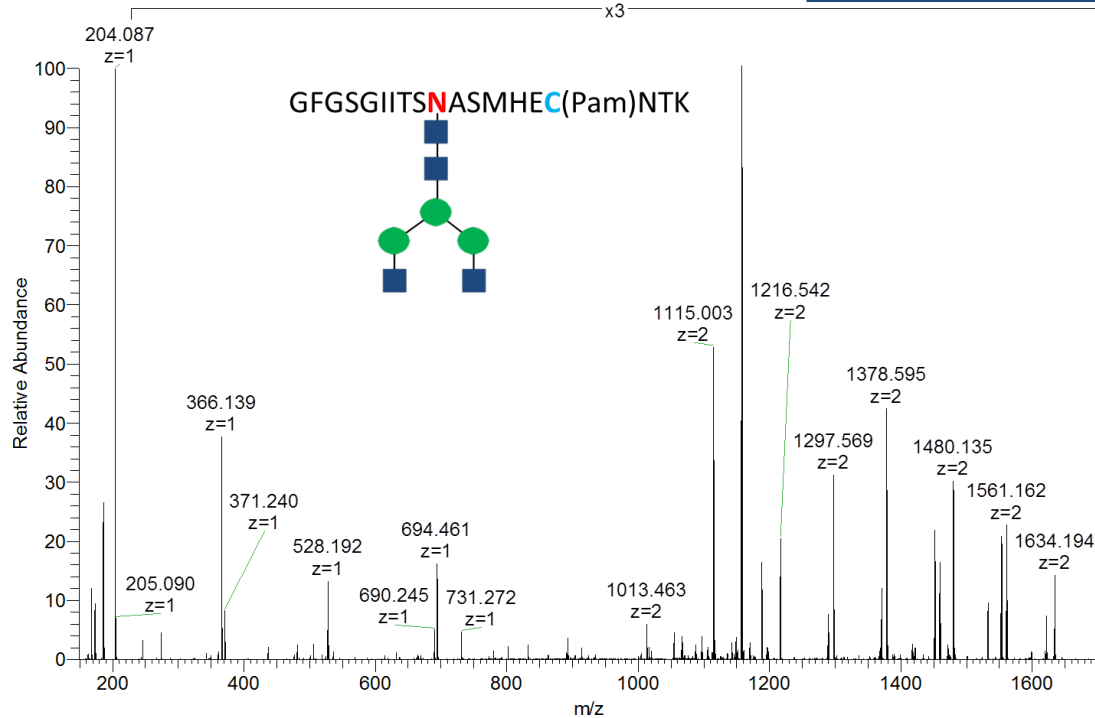


Abbildung 3-21. Vergleich der N-Glykosylierung von Wildtyp und Mutante. Exemplarisch ist das Peptid 278-296 von Wildtyp und Mutante dargestellt. Die Zusammensetzung der N-Glykanstruktur unterscheidet sich signifikant. Die Mutante weist im Gegensatz zum Wildtyp den Mannose-reichen Glykantyp auf. Der Wildtyp bildet N-Glykane des komplexen Typs.

3.10 Reinigung von H1 und Kristallisation

Hämagglutinin H1 aus HEK293-6E MGAT1 k.o. Zellen wurde aus 1 L Kultur 5 Tage nach der Transfektion (2.7.1) geerntet. Hierfür wurde zunächst der Überstand von den Zellen durch Zentrifugation separiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung durch eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).

Dabei kam eine 1 ml HisTrap-Excel Säule zum Einsatz, welche eine direkte Aufreinigung des zellfreien Kulturüberstands ohne eine vorherige Diafiltration des Mediums ermöglicht. Die Beladung und Elution von H1 erfolgte mit dem automatisierten Chromatographie-System Äkta Purifier. H1 wurde durch die Zugabe von 500 mM Imidazol in einem Schritt eluiert. Das zugehörige Chromatogramm und die Ergebnisse des SDS-PAGE und des Westernblots von der Produktion und Reinigung von H1 sind in Abbildung 3-22 dargestellt.

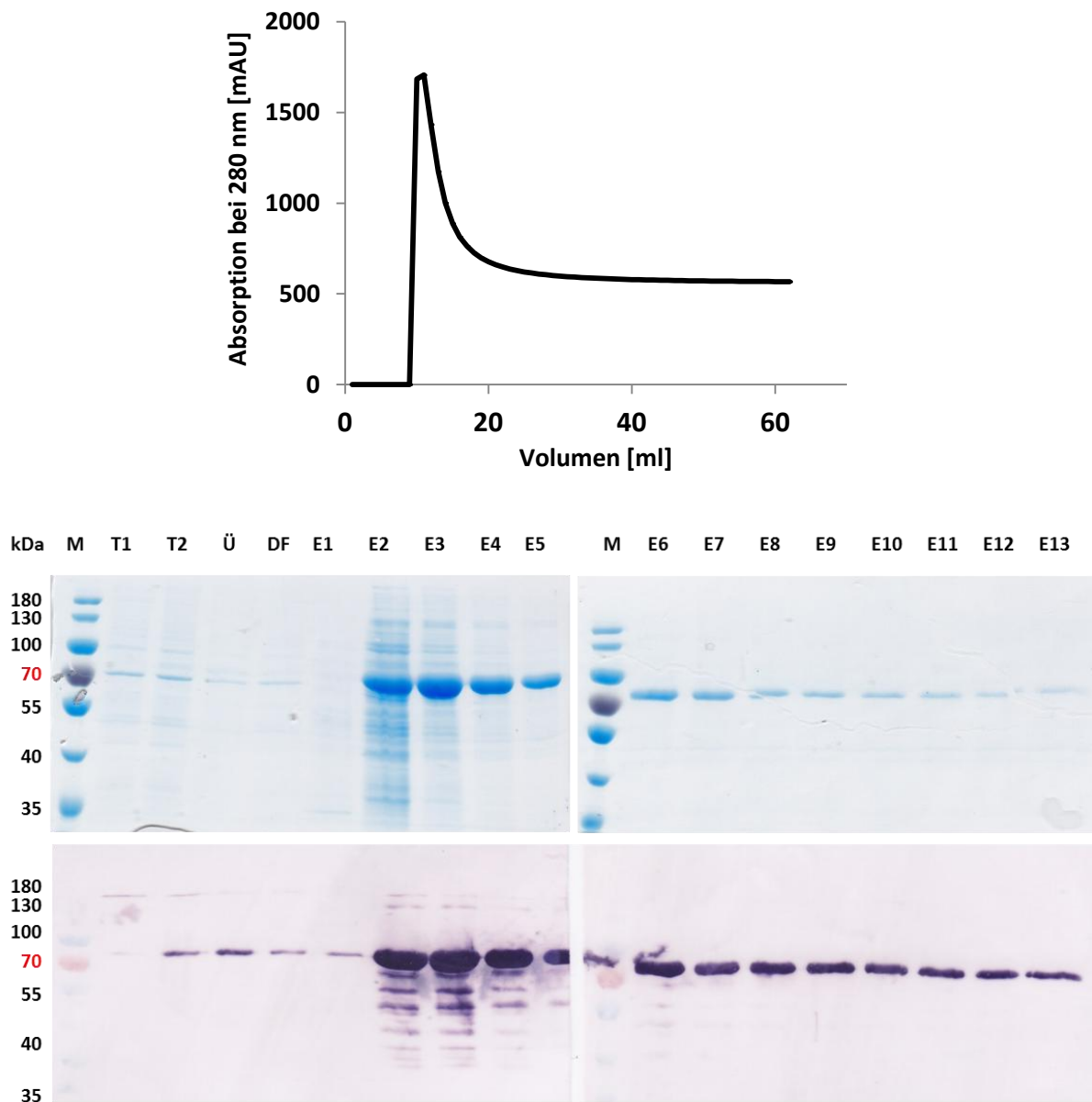


Abbildung 3-22: Produktion und IMAC-Reinigung von H1. H1 wurde aus 1 L transient transfizierter HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen 96 h nach der Transfektion aus dem Zellkulturüberstand durch Zentrifugation geerntet. Im ersten Reinigungsschritt wurde eine IMAC (His-Trap Excel) mit dem zellfreien Überstand durchgeführt. Die Absorption bei 280 nm entspricht der Kurve im Chromatogramm. Im SDS-Gel sind die Elutionsfraktionen E1 –E13 dargestellt. E2 – E5 enthaltenen den größten Teil des gereinigten H1. Wobei E2 – E4 neben H1 auch noch unspezifische Proteine aus dem Zellkulturüberstand aufweisen. E5 – E13 weisen bereits sehr reines H1 auf. Die Proteine wurden mittels 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Instant Blue angefärbt. T1 und T2 entsprechen den Proben nach 24 h (T1) bzw. 48 h (T2) nach der Transfektion der HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen. Ü ist der zellfreie Zellkulturüberstand nach der Zentrifugation. Bei DF handelt es sich um den Durchfluss bei der Beladung der 1 mL His-Trap Excel Säule.

His-gebundenes H1 eluiert in einem Peak bei ~72 kDa. Da Elutionsfraktion 2 und 3 noch Verunreinigungen mit unspezifischen Proteinen aus dem Zellkulturüberstand aufweisen, erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt über eine 1 mL HiTrap Talon-Säule. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen vereint und über Nacht bei 4 °C in

50 mM Tris-HCl pH 7,4 und 300 mM NaCl dialysiert. Die Elution erfolgte diesmal mit einem Imidazolgradienten (10 mM - 150 mM). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-23 dargestellt.

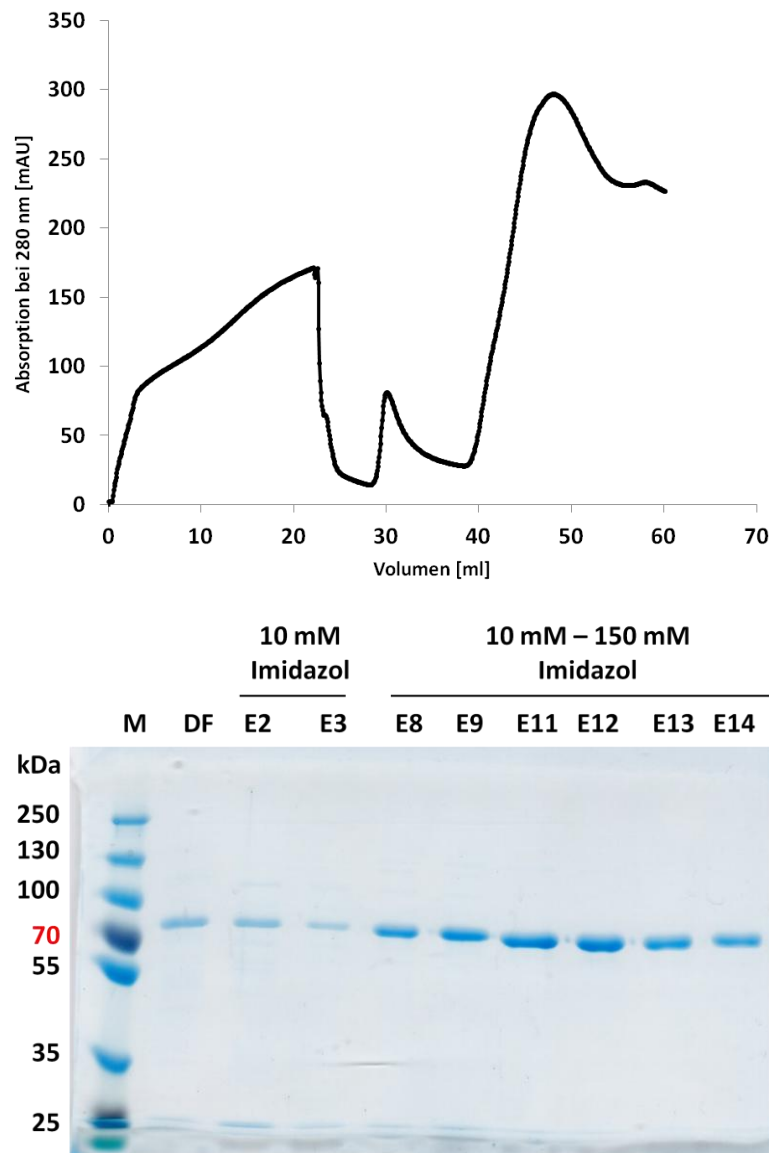


Abbildung 3-23. Reinigung von H1 mit HiTrap Talon. Nach der IMAC Reinigung wurden die noch unreinen Elutionsfraktionen vereint und in einem zweiten Reinigungsschritt mit Hilfe einer 1 mL HiTrap Talon-Säule gereinigt. Im Chromatogramm sind drei Peaks abgebildet. Diese entsprechen der Beladung der 1 ml HiTrap-Säule mit den vereinten Proben der IMAC, dem Waschschrift mit 10 mM Imidazol und der Elution mit einem Imidazolgradienten von 10 mM - 150 mM Imidazol. Im SDS-Gel kann man erkennen, dass sowohl der Durchfluss (DF), als auch E2 und E3 bereits H1 enthalten, was auf denaturiertes oder aggregiertes Protein hindeutet. Fraktionen E8 - E14 weisen reines H1 in höheren Konzentrationen auf.

Der Durchfluss als auch die Fraktionen E2 und E3 des Waschschrifts mit 10 mM Imidazol enthalten ungebundenes, möglicherweise denaturiertes H1. Die Elutionsfraktionen E8 bis E14 enthaltenen intaktes H1. Diese Fraktionen wurden vereint und über Nacht bei 4 °C in 50 mM Tris HCl pH 7,4 und 150 mM NaCl dialysiert.

Für eine anschließende Kristallisation wurden die Trimerisierungsdomäne sowie die Protein-Tags mit Hilfe von Thrombin abgespalten. Hierfür erfolgte zunächst eine

Aufkonzentration der dialysierten H1-Probe auf $\sim 700 \mu\text{l}$ und eine Inkubation für 3 - 4 h bei Raumtemperatur mit 2,5 U Thrombin/mg Protein. Zum Entfernen von Thrombin und der abgespaltenen Tags wurde eine Gelfiltration (SUPERDEX 200 Increase 10/300 GL) in 20 mM Tris HCl pH 7,4 und 50 mM NaCl durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-23 dargestellt. Bereits 4 h nach der Zugabe von Thrombin liegt H1 vollständig gespalten vor. Die Fraktionen F17 - F21 enthalten trimeres H1, welches bei $\sim 12 \text{ ml}$ eluiert. H1-Monomer eluiert bei $\sim 14 \text{ ml}$. Wie man dem Chromatogramm entnehmen kann, liegt der größte Teil des Proteins als intaktes Trimer vor.

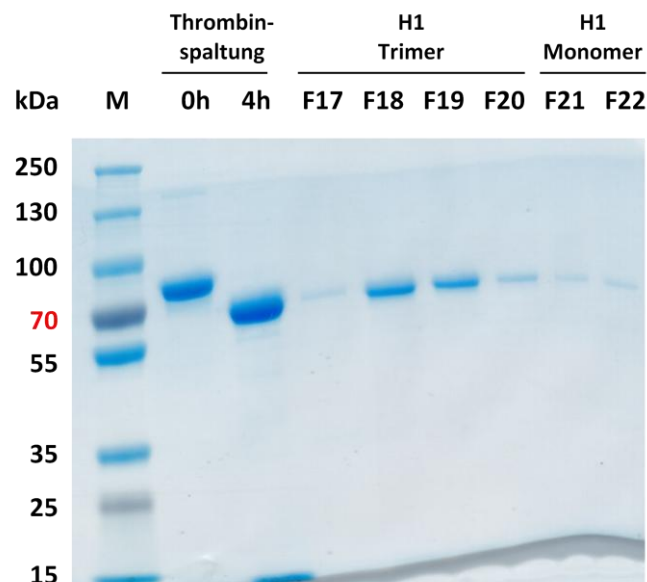
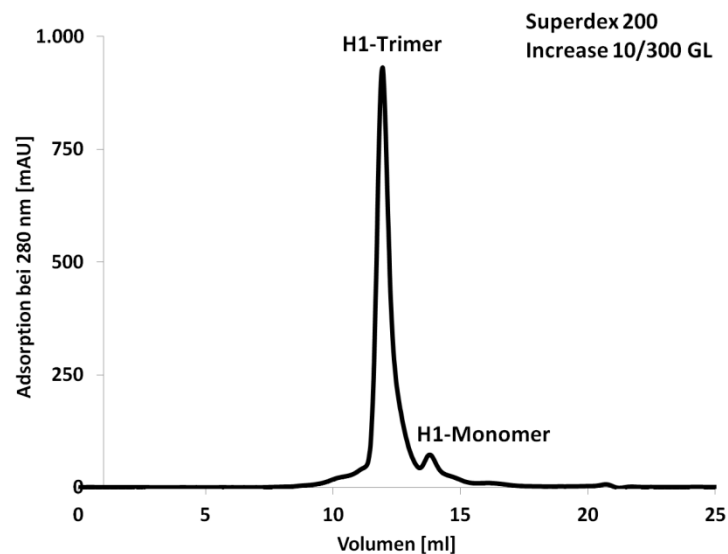


Abbildung 3-24 Ergebnisse der Thrombinspaltung und der Gelfiltration von H1. 4h nach der Zugabe von Thrombin ist H1 vollständig gespalten. Thrombin und Tags werden mit Hilfe einer Gelfiltration abgetrennt. Fraktionen F17-F20 gehören zum Peak des trimeren H1, wohingegen F21 und F22 dem zweiten Peak zugeordnet werden können, in welchem H1 als Monomer eluiert.

Die Fraktionen des H1-Trimers wurden vereint und auf 10 mg/ml aufkonzentriert. Es folgten erste Kristallisationsversuche von H1 aus HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen mit Hilfe der *sitting drop* Dampfdiffusionsmethode. In einem ersten Screening wurden dieselben Bedingungen wie bei H1 aus Insektenzellen getestet (Experimente von Margitta Schürig). Dabei kam der kommerziell erhältliche JCSG *plus*TM Screen von Molecular Dimensions zum Einsatz, welcher ebenfalls bei H1 aus Insektenzellen die besten Ergebnisse lieferte. Nach 3 – 7 Tagen bei 19 °C konnten erste Proteinkristalle unter der Bedingung 20 % PEG 3350 und 0,15 M Dinatriummalat verzeichnet werden (Abbildung 3-25). Sie lieferten jedoch noch keine aussagekräftigen Beugungsbilder bei der Röntgen-strahlenstrukturanalyse. Für die Erzeugung geeigneterer Kristalle, welche hochauflösende Beugungsbilder liefern, müssten die Kristallisationsbedingungen in weiterführenden Experimenten optimiert werden.

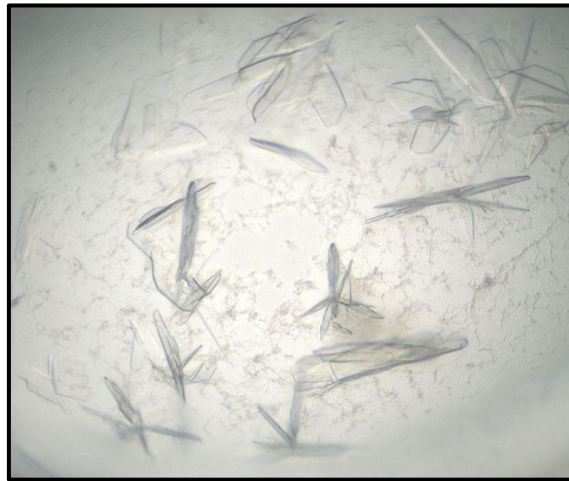


Abbildung 3-25. H1-Kristalle aus HEK293-6E MGAT1 k.o. Zellen. Der JCSG *plus*TM Screen von Molecular Dimensions führte zur Bildung erster H1 Kristalle.

4. Diskussion

4.1 Generation verbesserter CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzellen

In der biopharmazeutischen Industrie sind der Erfolg und die Konkurrenzfähigkeit eines Unternehmens zunehmend abhängig von der Anpassungsfähigkeit an den bestehenden Markt und der Schnelligkeit auf wechselnde Ansprüche reagieren zu können. Die wachsende Anzahl neuartiger biologischer Produkte und *biosimiliars* erfordern die Entwicklung von Produktionszelllinien mit hoher Produktivität. Die in der Industrie für diesen Zweck am häufigsten verwendeten Technologien basieren entweder auf dem Methotrexat (MTX) oder dem Glutaminsynthase (GS) System (siehe 1.2.2.). Bei beiden Systemen weisen die erhaltenen Zellklone durch die zufällige Genomintegration des Transgens eine hohe Heterogenität in Bezug auf die Expression auf. Aufgrund dieser Tatsache müssen große Menge an Zellklonen in aufwendigen Screeningverfahren untersucht werden bis schließlich der Wunschkandidat ausfindig gemacht werden kann, welcher eine hohe und stabile Transgenexpression aufweist. Dieser Prozess nimmt in der Zelllinienentwicklung in der Regel 6 - 12 Monate in Anspruch, ist außerordentlich arbeits- und kostenintensiv (Lai, Yang and Ng, 2013) und muss für jedes neu zu produzierende Transgen wiederholt werden. Gezielte genetische Manipulationen durch heterologe sequenzspezifische Rekombinationssysteme sind dabei hilfreiche Werkzeuge um diesen Selektionsprozess zu beschleunigen (Schlake and Bode, 1994; Kaufman *et al.*, 2008; Nehlsen *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2009). Hierbei wird das Genom der Wirtszelle zunächst durch das Einbringen eines mit cis-agierenden Rekombinase-Erkennungssequenzen flankierten Reporters markiert. Der DNA-Lokus dieser generierten „Masterzellen“ dient anschließend als Zielsequenz für den Rekombinase gesteuerten Kassettenaustausch und die sequenzspezifische Integration jedes beliebigen GOI. Hierdurch wird die Generierung von Produzentenzelllinien deutlich vereinfacht, da die Expressionseigenschaften der Masterzelle auf die Tochterzellen übertragen werden und somit eine reproduzierbare und vorhersagbare Transgenexpression ermöglicht wird (Huang *et al.*, 2007).

Ziel dieser Arbeit war es die Robustheit des RMCE, basierend auf dem FRT/Flp System von *Saccharomyces cerevisiae* für die glykosylierungsmutante Zelllinie CHO Lec3.2.8.1 zu verbessern. Diese Zelllinie dient der Expression von rekombinanten Glykoproteinen für die Strukturbiologie, da sie homogene N-Glykosylierungen des Mannose-reichen Typs katalysiert und sich deshalb hervorragend für die Kristallisation eukaryotischer Proteine eignet (Wilke *et al.*, 2010). Die Anwendung der bereits in der Arbeitsgruppe RPEX existierenden CHO Lec3.2.8.1 RMCE Masterzelllinie SMT_dneo(2)_24 (HZI) zeigte, dass sich in Bezug auf Austauscheffizienz, Stringenz der Klonselektion und Einsatz im Hochdurchsatzverfahren Schwierigkeiten ergeben, welche das System in ihrer Handhabbarkeit

einschränken und dabei den benötigten Arbeitsaufwand und die Dauer bis zur generierten Produzentenzelllinie unnötig erhöhen. Nach Identifikation der Schwachstellen des Systems wurde eine neue verbesserte CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzelllinie generiert, welche die vorherrschenden Defizite der ursprünglichen Zelllinie kompensieren sollte. Dafür wurde zunächst ein neuer Tagging-Vektor generiert. Neben einem per se stärkeren viralen Promotor, dem SV40 (Khan, 2013; Sakaguchi *et al.*, 2014) wurde statt des einfachen GFP-Gens, welches in der existierenden Masterzelllinie SMT_dneo(2)_24 vorhanden ist, ein Fusionsgen bestehend aus Hygromycinphosphotransferase, Thymidinkinase und GFP in den Tagging-Vektor integriert um eine stringenter Selektion der Produzentenzellen zu ermöglichen. Aufgrund der zuvor beobachteten unzureichenden Antibiotikaselektion mit G418 wurde die Selektionsfalle Δ neoR gegen das sensitivere Puromycin-Resistenzgen (Δ Puro) ausgetauscht. Nach Transfektion dieses Vektors und zufälliger Integration in das Genom erfolgte zunächst die Isolation von Klonen, welche eine hohe und stabile Transkriptionsrate des Reporterproteins aufwiesen.

4.2 Isolation stabil exprimierender Zellklone

Das wichtigste Kriterium einer Produktionszelllinie ist die Identifikation und Isolation eines Expressionslokus, welcher eine hohe und stabile Transgenaktivität ermöglicht. Konventionell wird hierfür das Transgen durch zufällige Genomintegration eingebracht, wodurch sowohl der Integrationsort als auch die Kopienzahl des Transgens Einfluss auf die Expressionsstärke und -dauer ausüben können. Um geeignete chromosomale "Hot Spots" ausfindig zu machen, werden die isolierten Zellklone intensiven Screenings unterzogen. Der Selektionsprozess muss dabei für jedes neue rekombinante Protein wiederholt werden, was sehr viel Zeit in Anspruch nehmen kann.

Der Rekombinase gesteuerte Kassettenaustausch (RMCE) verhindert die Notwendigkeit des für jedes beliebige Transgen erforderlichen Screenings. Ein einmal markierter und charakterisierter genomischer Integrationsort ermöglicht die Vorhersagbarkeit der Transgenaktivität jedes generierten Subklons.

In dieser Arbeit wurde zur Generierung der neuen verbesserten CHO Lec3.2.8.1 RMCE-Masterzelllinie eine Kombination aus Antibiotikaselektion und mehreren Runden FACS gewählt. Die Zellen wurden zunächst mit dem Tagging-Vektor, welcher als zirkuläres Plasmid vorlag, mit Hilfe der Nucleofector™ Technologie (AMAXA) transfiziert. Dieses Vorgehen erhöht nach Lehner *et al.* (2013) die Transfektionseffizienz gegenüber der Transfektion mit linearisiertem Vektormaterial und führt zu einer größeren Anzahl stabiler Integrierten. Nukleofektion ist dabei eine geeignete Methode um Einzelkopien in die Zelle einzubringen und Tandem-Kopien

zu verhindern (Nehlsen *et al.*, 2009). Anschließend wurden die Zellen mit 500 µg/ml Hygromycin B einem Selektionsdruck unterzogen um die Integrationshäufigkeit weiter zu erhöhen. Eine hohe Selektionsstringenz führt zu überlebenden Zellklonen mit hohem Transkriptionslevel (Schimke *et al.*, 1984). Dies kann einerseits durch erhöhte Genamplifikation hervorgerufen werden oder durch die Integration in einen transkriptionell aktiven genomischen Lokus („Hot Spot“). FACS diente darüber hinaus zur Isolation der höchstexprimierenden GFP markierten Klone und zur Überwachung der Langzeitstabilität (Kaufman *et al.*, 2008). Nach zwei Runden präparativen FACS (Abbildung 3-4) wurden Einzelklone durch *clone picking* und serielle Verdünnung isoliert und auf stabile und gleichbleibend hohe Transgenexpression überprüft. Nach Revitalisierung und mehrwöchiger Kultivierung zeigte sich ein Rückgang der Expressionshöhe und schließlich ein Verlust der Transgenaktivität bei zahlreichen Klonen. Erst durch die kontinuierliche Kultivierung unter Selektionsdruck (Hygromycin B) konnte die Transgenexpression aufrechterhalten werden.

Die beobachtete Reduktion bzw. der komplette Verlust der Transgenaktivität kann ein Zeichen für Gen-Silencing, chromosomales Rearrangement (Yoshikawa *et al.*, 2000) oder andere epigenetische Mechanismen sein, bei denen Sequenzen des eingebrachten Fremdgens mit der endogenen DNA interagieren (Emerman und Temin, 1984; Whitelaw *et al.*, 2001). Neben diesem sog. Positionseffekt kann auch die Kopienzahl des Transgens bzw. ihre räumliche Anordnung (*Tandem-Repeats*) zu einer Genstilllegung führen (McBurney *et al.*, 2002).

Infolge der genomischen PCR konnte die Vollständigkeit der Transgenkassette und das Vorhandensein von *Tandem-Repeat* Integrationen ausgeschlossen werden (Abbildung 3-6). Bislang konnten jedoch keine Rückschlüsse auf die Anzahl integrierter Transgenkassetten gezogen werden. Ein Southern Blot würde hier ein geeignetes Verfahren darstellen um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um eine stabil integrierte Einzelkopie handelt.

Neben Integrationsort und Kopienzahl hat auch die Größe und genetische Zusammensetzung des Transgens Einfluss auf die Genaktivität. So handelt es sich bei dem Fusionsgen HTG im Gegensatz zu einem einfachen eGFP-Gen (744 bp) um ein sehr langes Gen (2877 bp), welches die Zelle nur dann konstitutiv produziert, wenn es ihr einen entscheidenden Überlebensvorteil bietet, also bei Anwesenheit von Antibiotikum, in diesem Fall von Hygromycin B. Bei Abwesenheit des Selektionsdrucks wird die Genexpression von der Zelle stillgelegt, da der Energieaufwand für eine dauerhafte Expression zu hoch ist und der Zelle wieder mehr Energie und Ressourcen für das Zellwachstum bzw. Zellteilung zur Verfügung stehen.

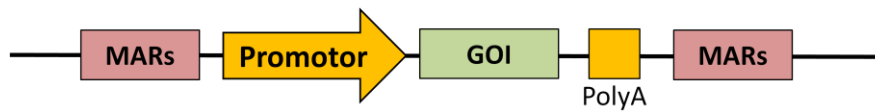
Die Zusammensetzung der DNA kann ebenfalls die Aktivität eines Gens beeinflussen. So liegen CG-Dimere in der DNA-Sequenz meist methyliert vor, wodurch die Transgenaktivität reguliert werden kann. Daher befinden sich diese Sequenzmotive bevorzugt in Promotorregionen, wo sie die Aktivität eines Gens

steuern (Newell-Price *et al.*, 2000). Die eingebrachte Fremd-DNA ist nach erfolgreicher Genomintegration den Einflüssen der genetischen Umgebung ausgesetzt. So können regulatorische DNA-Motive, welche sich zum Teil mehrere hundert Basen vom eigentlichen Integrationsort entfernt befinden (Enhancer, Silencer), Einfluss auf die Transgenaktivität ausüben. Auch Histonmodifikationen wie z.B. die Acetylierung oder Methylierung und die damit verbundene Chromatinorganisation kann die transkriptionelle Aktivität der entsprechenden Genregion beeinflussen.

Um eingebrachte DNA vor negativen regulatorischen Einflüssen zu schützen, gibt es eine Reihe von epigenetischen Regulatoren, welche man sich beim Design des Expressionsvektors zu Nutze machen kann um eine stabile Transgenexpression unabhängig von Integrationsort zu bewirken (Abbildung 4-1). Dazu zählen u.a. S/MARs (*matrix scaffold/matrix attachment region*), kurze genomische DNA Sequenzen, welche Ankerpunkte der DNA für das Chromatingerüst bilden und dazu dienen das Chromatin in Strukturdomänen anzuordnen (Mirkovitch, Mirault and Laemmli, 1984). Sie sind nachweislich an der Regulation der Genexpression beteiligt, da sie durch die Ausbildung von Chromatinloops eine transkriptionell aktive Chromatinstruktur aufrechterhalten können. MARs sind darüber hinaus mit erhöhter Histonhyperacetylierung assoziiert, was indirekt zu einer Demethylierung von DNA beiträgt und die DNA zugänglich für den Transkriptionsapparat macht (Jost *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Neben ihrer Chromatin-modellierenden Funktion, dienen MARs darüber hinaus als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. dem CCCTC *binding factor* (CTCF) und nukleären Matrixproteinen (NMP) um die Genexpression zu erhöhen (Bell, West and Felsenfeld, 1999; Girod *et al.*, 2007). Durch die Verwendung als cis-agierende Elemente oder durch Flankieren des Transgens mit MARs konnte gezeigt werden, dass sich die Häufigkeit von hoch produzierenden Klonen steigern lässt (Kim *et al.*, 2004, 2008; Girod, Zahn-Zabal and Mermoud, 2005; Maksimenko, Gasanov and Georgiev, 2015).

Neben S/MARs gibt es auch sogenannte Insulatorelemente wie das UCOE (*Ubiquitous Chromatin Opening Element*), welches von Merck vertrieben wird (Benton *et al.*, 2002). Es handelt sich dabei um eine methylierungsfreie CpG-Insel, welche das Chromatin in einer offenen Konfiguration hält, wodurch die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie erhöht wird (de Poorter *et al.*, 2007). So konnte die Antikörperproduktion in CHO-Zellen bereits deutlich gesteigert werden, nachdem UCOEs in den Expressionsvektor integriert worden waren (Benton *et al.*, 2002). Durch UCOEs konnte außerdem der Anteil an hochproduzierenden Zellen eines stabil transfizierten Zellpools erhöht werden, wodurch eine 6-fach höhere Antikörperproduktion erzielt werden konnte (Ye *et al.*, 2010).

Matrix Attachment Region (MARs)



Ubiquitous chromatin opening element (UCOE)

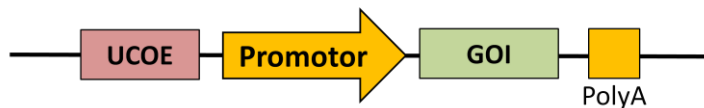


Abbildung 4-1: Regulatorische Elemente zur Erhöhung der stabilen Transgenexpression (nach Lai et al. 2013).

4.3 Erhöhung der Austauscheffizienz und Isolation der Produzenten- zellen nach RMCE

Der Rekombinase gesteuerte Kassettenaustausch aus *Saccharomyces cerevisiae* beruht auf der Rekombination zwischen identischen RT-Sequenzen. Durch das Flankieren des GOI mit zwei heterospezifischen Erkennungssequenzen (FRT₃ und FRT_{WT}) ist eine Rekombination nur bei Anwesenheit des Austauschvektors, welcher mit denselben heterologen FRT-Sequenzen flankiert ist, möglich (Schlake and Bode, 1994). Die Rekombinase Flippase katalysiert hierbei den gerichteten Kassettenaustausch. Die Austauschrate ist jedoch sehr gering. Um die Austauscheffizienz zu erhöhen und die Selektion positiv ausgetauschter Zellklone zu vereinfachen, wurde in dieser Arbeit neben einer Promotor- und Selektionsfalle zusätzlich mit einem negativen Selektionsmarker gearbeitet, welcher von den neu generierten Masterzellen dauerhaft exprimiert wird – der Thymidinkinase. Durch die Selektion mit Ganciclovir können nicht-ausgetauschte Zellen im Wachstum gehemmt und schließlich aus dem transfizierten Zellpool entfernt werden. Ganciclovir wird dabei von der Thymidinkinase in ein phosphoryliertes Nukleotidanalogen konvertiert, welches nach Einbau in die DNA zum Kettenabbruch und letztendlich zum Zelltod führt (Moolten, 1986; Toledo et al., 2006).

Bei der bereits existierenden Masterzelllinie SMT_dneo(2)_24 wurde als Selektionsfalle Δ neoR verwendet, was jedoch nur zu einer unzureichenden Selektionsstringenz aufgrund einer Präresistenz der CHO Lec3.2.8.1 gegenüber G418 beitrug. Deshalb wurde in den neu generierten Masterzellen KKA-SVHTG(2)_1 eine Puromycin-Selektionsfalle gewählt, da CHO Lec3.2.8.1 nachweislich sensibler gegenüber Puromycin ist (Doktorarbeit, Bahar Baser, HZI). Infolge des gerichteten Kassettenaustauschs wird das Δ Puro-Gen durch das Einbringen des fehlenden Promotors und eines ATG-Startcodons komplementiert und die Zellen können durch die Zugabe

von Puromycin auf positive Austauschreaktionen selektioniert werden. Der Verlust der GFP-Expression korreliert dabei direkt mit einem erfolgreichen Kassettenaustausch und kann mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie bzw. Durchflusszytometrie verfolgt werden. Durch die Kombination aus positiver und negativer Selektion war es in dieser Arbeit möglich Produzentenzellen in kürzerer Zeit (2 - 4 Wochen) als mit der bislang verwendeten Methode zu gewinnen (Abbildung 3-8). Im Gegensatz zur alten Masterzelllinie war eine erneute Klonisolation über zeitintensive serielle Verdünnungen nicht notwendig. Nur Zellen, welche die Kasette des Targeting-Vektors, welcher tdTomato als Reporterprotein trug, erfolgreich gegen die Kasette des Tagging-Vektors ausgetauscht hatten, überlebten die Doppelselektion mit Ganciclovir und Puromycin. Die Stringenz dieser Selektionsmethode zeigte sich auch in Experimenten von Schucht (2006) und Nehlsen *et al.* (2009) bei den die Austauscheffizienz ~100 % betrug.

Neben der Doppelselektion zur Erhöhung der Selektionsstringenz wurde in dieser Arbeit ebenfalls versucht, eine effizientere Transfektionsmethode zum Einbringen des Flippase-kodierenden Vektors bzw. des Targeting-Vektors zu finden. Hierdurch sollte der Anteil ausgetauschter Zellen erhöht werden, wodurch die Zeit bis zur Produktionszelllinie weiter verkürzt werden könnte. Wenn mehr Zellen den Selektionsprozess überleben, weil insgesamt mehr Austauschreaktionen stattfinden, kann früher mit einer Kultivierung im Bioreaktor aufgrund einer ausreichend hohen Zelldichte gestartet werden. Die Verwendung eines Zellpools für die rekombinante Proteinproduktion ist aufgrund der isogenen Eigenschaften der generierten Subklone vorstellbar und wird bereits genutzt (Schucht *et al.*, 2011).

Das Transfektionsreagenz FektoPRO™ erwies sich im Gegensatz zur herkömmlich eingesetzten Nukleofektion als deutlich bessere Methode um einen höheren Anteil stabil ausgetauschter Zellklone zu erzeugen (Abbildung 3-7). Nach einer Woche (168 h) waren >25 % der Zellen tdTomato-positiv, was auf eine stabile Integration infolge des RMCE zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu wiesen weniger als 2 % aller Zellen eine stabile tdTomato-Expression unter Verwendung der Standardtransfektionsmethode auf.

4.4 CRISPR/Cas9 gesteuerter MGAT1-Knockout in HEK293-6E-Zellen

Strukturbiologische Informationen über komplexe Glykoproteine sind von immer größeren Interesse, da sie entscheidende Funktionen im menschlichen Körper ausüben und u.a. eine wesentliche Rolle bei der Erkennungsreaktion des Immunsystems spielen. Die Produktion dieser Proteinklasse ist, aufgrund ihrer komplexen Faltungen und posttranslationalen Modifikationen, in erster Linie auf eukaryotische Expressionssysteme angewiesen, welche wiederum deutlich höhere

Kosten und mehr Arbeitsaufwand verursachen. Darüber hinaus kann die für die Röntgenstrukturanalyse notwendige Proteinkristallisation durch die heterogenen und teilweise sehr komplexen Glykosylierungen gehemmt sein (Butters *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2007; Davis and Crispin, 2010). Da das vollständige Fehlen der Glykanstruktur häufig zu ungefaltetem, nicht-funktionalem Protein führt, kann die Verwendung von glykosylierungsmutanten Zelllinien einen entscheidenden Vorteil liefern (z.B. CHO Lec3.2.8.1, HEK293S). Sie produzieren in der Regel Proteine mit verkürzten und homogenen Zuckerresten des Mannose-reichen Typs, welche schon oft erfolgreich für die Kristallisation eingesetzt wurden (Büssow, 2015). Sollte es trotzdem zu Problemen bei der Kristallisation kommen, können diese ganz einfach durch Endoglykosidasen abgespalten werden, was eine Kristallisation begünstigen kann (Lee, Fusco and Ollmann Saphire, 2009). Auch wenn Hefen ebenfalls Proteine mit Mannose-reichen Glykanstrukturen synthetisieren, gestaltet sich insbesondere die Sekretion von Proteinen, welche von Säugerzellen abstammen, oft als problematisch (Chang *et al.*, 2007).

Ein wesentlicher Nachteil bei eukaryotischen Expressionssystemen ist die geringe Proteinausbeute verglichen mit prokaryotischen Systemen. Eine Möglichkeit dieses Defizit auszugleichen ist die Generierung einer stabilen Zelllinie und die Proteinproduktion im großen Maßstab durch die Verwendung eines Bioreaktors. Doch selbst dann sind die Proteinausbeuten sehr gering und liegen bei zum Teil bei ~1 mg pro Liter. Auch wenn in den letzten Jahren bereits viel auf dem Gebiet der Zelllinienentwicklung geschehen ist um die spezifische Produktivität bzw. maximale Zelldichte zu steigern (Astley and Al-Rubeai, 2008; Hwang and Lee, 2009; Cost *et al.*, 2010; Dreesen and Fussenegger, 2011), sind die Kosten und v.a. der Zeit- und Arbeitsaufwand zur Generierung einer stabilen Zelllinie immens.

Eine willkommene Alternative stellt die HEK293-6E Zelllinie (Durocher *et al.* 2002) dar. Sie exprimiert stabil das nukleäre Antigen EBNA1 des Epstein-Barr Virus und ermöglicht somit eine semistabile Proteinproduktion von oriP-enthaltenen Plasmiden über einen Zeitraum von 5 - 7 Tagen, wodurch in der Vergangenheit bereits Ausbeuten eines scFv-Fc-Antiköpers von bis zu 600 mg/l erzielt werden konnten (Jäger *et al.*, 2013). Neben der hohen Produktivität eignet sich diese Zelllinie darüber hinaus besonders gut für das transiente Screening mehrerer Varianten eines Genkonstrukts, da sich nicht jedes Konstrukt in ausreichenden Mengen produzieren bzw. stabil aufreinigen lässt. Da sich die HEK293-6E Zelllinie hervorragend für die transiente Proteinproduktion eignet und die exprimierten Proteine die erforderlichen post-translationalen Modifikationen besitzen, welche für eine korrekte Faltung und Funktion eukaryotischer Proteine notwendig sind, waren diese Zellen Ausgangspunkt für die Generierung einer glykosylierungsmutanten Zelllinie.

Hierfür wurde ein Teil des MGAT1-Gens, welches das für die Ausbildung der komplexen N-Glykosylierungen verantwortliche Enzym GnT-I (N-Acetylglucosaminyltransferase) kodiert mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie deletiert. Um

einen vollständigen Funktionsverlust des zugrundeliegenden Gens sicherzustellen, wurden in dieser Arbeit zwei gRNAs eingesetzt, wodurch eine Deletion eines ~400 bp großen Fragments im MGAT1-Lokus bewirkt werden konnte (Abbildung 3-15). Auch wenn in der Regel die Anwesenheit einer gRNA für den vollständigen Gen-Knockout ausreicht, gestaltet sich häufig die Charakterisierung der erfolgreichen Mutation auf DNA-Ebene als aufwändig. Der CRISPR/Cas9 verursacht in der Regel nur kleine Insertionen oder Deletionen (InDels), wodurch eine Verschiebung des Leserasters (ORF) erfolgt, die u.a. zu einer vorzeitigen Termination der Translation beiträgt und einen vollständigen Funktionsverlust des Phänotyps bewirkt. Um diese InDels nachzuweisen gibt es eine Reihe, teilweise sehr aufwändiger Screeningverfahren (z.B. Subklonierung und Sequenzierung; PCR und Mismatch Cleavage-Assays etc.). Die Verwendung von zwei gRNAs, welche die Deletion eines größeren DNA-Fragments verursachen (>100 bp) ermöglicht den schnellen und einfachen Nachweis mit Hilfe von PCR und Agarose-Gelelektrophorese (Chen *et al.*, 2014).

Hierfür wurden zwei PCR-Primer designt, welche den gesamten MGAT1-Lokus (1302 bp) flankieren. Als Nachweis der erfolgreichen CRISPR/Cas9 gesteuerten Deletion diente ein um 400 bp verkürztes PCR-Fragment.

Für einen vollständigen Genverlust ist es notwendig, dass die entsprechende Deletion in beiden Allelen vorliegt, also homozygot ist. Hierfür wurden die Zellen 24 h nach der Kotransfektion der für den CRISPR/Cas9 gesteuerten Knockout relevanten Vektoren nach GFP exprimierenden Zellen sortiert. Die genomische PCR des isolierten Zellpools führte zunächst zu der Annahme, dass die Deletionseffizienz im MGAT1-Gen bei ~100 % lag (Abbildung 3-14). Nach Expansion des isolierten Zellpools wurden Einzelklone durch *clone picking* isoliert und erneut auf homozygoten Knockout untersucht. Bei einem Teil der isolierten Klone konnte gezeigt werden, dass nur ein heterozygoter Knockout vorlag. Dies kann u.U. darauf zurückgeführt werden, dass in diesen Zellen keine oder nur eine der beiden gRNAs exprimiert wurde oder der CRISPR/Cas9 gesteuerte DSB unvollständig gewesen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine genaue Charakterisierung der genetischen Modifikation notwendig ist, um sicherstellen zu können, dass die gewünschte Mutation vollständig ist.

Dies ist besonders dann erforderlich, wenn ein zusätzliches DNA-Fragment in den Ziellokus eingebracht werden soll, da nicht der HDR sondern die NHEJ als DNA-Reparaturmechanismus bevorzugt stattfindet. Lee *et al.* (2015) konnte zeigen, dass die Effizienz bei der Erzeugung von InDels in CHO durch NHEJ mit 16.4 – 56.8% deutlich höher ist, als das HDR-gesteuerte Einbringen exogener DNA, welches nur mit einer Effizienz von 7.4 – 27.8% stattfand.

Die Erzeugung des CRISPR/Cas9 gesteuerten MGAT1 Knockouts in HEK293-6E bestätigt, dass es sich insgesamt um ein hoch effizientes, robustes und einfach zu handhabbares System handelt (Yan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

4.5 Produktion und Aufreinigung von Hämagglutinin H1

Da es sich bei Hämagglutinin H1 um ein virales Glykoprotein handelt, welches fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt, wurde es als Modelprotein für die Produktion mit Hilfe der neu generierten HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie eingesetzt. Es sollte zunächst gezeigt werden, dass H1, welches mit der MGAT1 Knockout Zelllinie produziert wurde, eine veränderte N-Glykosylierung aufweist (*high-mannose*). Darüber hinaus sollte anhand der Produktion von Hämagglutinin H1 der Nachweis erbracht werden, dass sich die neu generierte Zelllinie aufgrund des veränderten N-Glykosylierungsstoffwechsels hervorragend für die Produktion und Kristallisation von Glykoproteinen eignet.

Die Klonierung und Erarbeitung der Reinigungsstrategie sowie geeigneter Kristallisationsbedingungen waren nicht Bestandteil dieser Arbeit, sondern wurden von Margitta Schürig im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

Das Proteinkonstrukt (Abbildung 3-17) lag für die Produktion in den HEK293-6E bzw. HEK293-6E MGAT1 K.o. Zellen im Multi-Host Vektor pFlpBtM-II (siehe 1.5) vor und enthielt eine C-terminale Trimerisierungsdomäne („Foldon“) aus dem Bakteriophagen T4, welche sich für eine stabile Produktion und Reinigung als vorteilhaft erwiesen hat (Stevens *et al.*, 2004). In einem ersten Expressionsversuch wurde H1 parallel in der HEK293-6E und in der HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie in einem Gesamtvolumen von 50 ml produziert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Expression mit Hilfe eines Westernblots. Um H1 auch auf SDS-PAGE-Niveau nachweisen zu können wurden Teile des Überstandes mit Hilfe magnetischer His-Beads gereinigt und aufkonzentriert. Der Höhenunterschied der H1-Banden aus Wildtyp und Mutante belegen einen charakteristischen Masseunterschied, der sich auf die veränderte N-Glykosylierung in der MGAT1-Mutante zurückführen lässt. Im nächsten Schritt wurden die H1-Banden von Wildtyp und Mutante aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und einer MALDI-TOF Vollmassebestimmung unterzogen (Manfred Nimtz, HZI). Die sich hieraus ergebenden Spektren (Abbildung 3-19) weisen den Massenunterschied auf molekularer Ebene nach. H1 aus der Mutante besitzt eine um ~2000 Da kleinere Molekülmasse. Um die genaue Zuckerzusammensetzung der besetzten Glykosylierungsstellen und die dazugehörige Peptidsequenz zu ermitteln, wurde eine Elektronenspray Ionisation MSⁿ Massenspektrometrie (ESI/MSⁿ) mit den aufgereinigten Proteinproben durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, dass die fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen von H1, welches von der MGAT1-Mutante exprimiert wurde, ausschließlich mit dem *high-mannose* Typ besetzt sind. Im Gegensatz dazu wurde exemplarisch für ein ausgewähltes Peptid gezeigt, dass es sich beim Wildtyp um eine N-Glykanstruktur des komplexen Typs handelt. Die Ermittlung der N-Glykanstruktur und die genaue Sequenzzuordnung beim Wildtyp erwies sich jedoch als deutlich schwieriger, was sich auf die heterogene Zuckerzusammensetzung und auf die variable Länge der Glykanseitenketten zurück-

führen lässt (Parker *et al.*, 2010). Hinzukommt, dass sich aufgrund der komplexen N-Glykanstrukturen sehr hohe Molekülmassen ergeben (mehrere 1000 Da), die teilweise außerhalb des zu analysierenden Massebereichs liegen können. Die Reinigungsmethode der zu analysierenden Proteinprobe spielt dabei ebenfalls eine wesentliche Rolle. So kann die Extraktion der Proteine aus Polyacrylamid-Gelen teilweise zum Verlust von Peptidsequenzen führen, wodurch eine vollständige Peptidsequenzabdeckung unmöglich wird (Larsen *et al.*, 2001).

Für die H1-Produktion wurde insgesamt 1 Liter Zellkultur transfiziert. Nach 5 Tagen erfolgte die Ernte des Überstands. H1 wurde mittels Affinitätschromatographie (HisTrap Excel) durch das Vorhandensein eines C-terminalen His-Tags (His₈) aufgereinigt. Infolge eines Thrombinverdaus wurden die Foldonsequenz sowie die Protein-Tags vom Protein abgespalten und mit Hilfe der Gelfiltration entfernt. Für eine anschließende Kristallisation wurde H1 auf 10 mg/ml aufkonzentriert, da mit dieser Konzentration bereits erfolgreich H1-Kristalle für die Strukturaufklärung erzielt werden konnten (Stevens *et al.*, 2004; K. J. Cho *et al.*, 2014; W. Wang *et al.*, 2016). In einem ersten Kristallisationsversuch wurde der JSCGplusTM-Screen getestet, welcher bereits für die Kristallisation von H1 aus *Hi5* Insektenzellen eingesetzt wurde. Erste Kristalle (dünne Plättchen) konnten bereits 3 - 4 Tage nach Ansetzen der Kristallisationsplatte beobachtet werden. Ihre räumliche Struktur lieferte jedoch keine aussagekräftigen Diffraktionsbilder bei der Röntgenstrahlbeugung. Um Kristalle von höherer Qualität und Größe zu erzeugen, werden normalerweise die initialen Screeningbedingung für eine erneute Kristallisation verfeinert. Hierfür wird die Zusammensetzung der Lösung in der Regel nur geringfügig verändert (z.B. pH-Wert, Konzentration oder auch die Temperatur). Da nur unzureichende Mengen an Protein vorhanden waren und nicht mehr genügend Zeit für eine erneute Produktion und Reinigung im Rahmen der Doktorarbeit zur Verfügung standen, konnten diese Experimente nicht mehr durchgeführt werden. Die bislang resultierten Ergebnisse sind jedoch vielversprechend und dienen als Beleg dafür, dass sich die HEK293-6E MGAT1 K.o. Zelllinie für eine Reinigung des Glykoproteins H1 eignet und dass es sich ohne weitere Deglykosylierungsschritte erfolgreich kristallisieren lässt.

Ausblick

Durch die Entschlüsselung zahlreicher CHO-Genome und deren kürzliche Veröffentlichung (Xu *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2013) ist es nun möglich das Genom gezielt durch sequenzspezifische Nukleasen zu manipulieren. Maßgeschneiderte Nukleasen wie ZFNs, TALENs oder CRISPR/Cas RNA gesteuerte Nukleasen wurden bereits in einer Vielzahl von Organismen und Zelltypen genutzt um Mutationen in Form von Insertionen/Deletionen (InDels) zu induzieren (Carroll, 2014). Die Reparatur eines Nuklease katalysierten DNA-Doppelstrangbruchs erfolgt dabei über zwei mögliche Mechanismen: dem *Non-Homologous End-Joining* (NHEJ) und dem *Homology-Directed Repair* (HDR). HDR kann dabei gezielt genutzt werden um den endogenen DNA-Lokus präzise durch die Anwesenheit exogener DNA mit homologen DNA-Sequenzen zu modifizieren. Obwohl der HDR nicht den von der Zelle bevorzugten Reparaturmechanismus darstellt, wurde er bereits erfolgreich für die gerichtete Genintegration mit Hilfe sequenzspezifischer Nukleasen in einer Reihe von Säugerzellen verwendet (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Verglichen mit proteinbasierenden genommodifizierenden Werkzeugen wie den ZFNs und TALENs, handelt sich bei der jüngeren CRISPR/Cas9-Technologie um eine deutlich einfachere, effizientere und kostengünstigere Methode um Fremd-DNA gezielt zu manipulieren. Lee *et al.* (2015) konnte mit Hilfe diese Methode und einer anschließenden Antibiotikaselektion die Insertion einer 3.7-kb großen Expressionskassette in drei verschiedene genomische Loci von CHO-S Zellen (MGAT1, COSMC, LdhA) erreichen. Auch wenn die Integrationseffizienz bei CHO bislang verglichen mit anderen Zelllinien relativ niedrig ist, könnte diese Technologie erfolgreich für die Entwicklung von stabilen Zelllinien eingesetzt werden. Hierfür ist es in erster Linie notwendig genomische Bereiche innerhalb des CHO-Genoms zu identifizieren, welche eine hohe und stabile Transgenexpression besitzen, sogenannte „*Safe harbors*“ oder „*Hot spots*“. Um solche Regionen schnell und einfach ausfindig zu machen, könnten die vor Kurzem unternommenen Studien zur Identifikation bevorzugter genomischer Integrationsorte in menschlichen Zellen behilflich sein (Lombardo *et al.*, 2011; Ramakrishna *et al.*, 2014).

Die CRISPR/Cas9-Technologie stellt eine attraktive Alternative bzw. Erweiterung des Flp/FRT-Systems dar, da hierdurch gezielt DNA-Sequenzen angesteuert und durch das Einbringen exogener DNA stabil modifiziert werden können. Das durch zufällige Genintegration (z.B. der Tagging-Kassette beim RMCE) notwendige und sehr zeitintensive Screening nach Zellen, welche einerseits nur eine Genkopie enthalten um Kreuzreaktionen vorzubeugen und andererseits das Transgen stabil und in möglichst hohen Mengen exprimieren, entfallen. Darüber hinaus ist es nicht erforderlich zusätzliche cis-regulierende Sequenzen (S/MARs etc.) innerhalb der Expressionskassette einzubringen um Gen-Silencing zu verhindern. Auch die Gefahr

essentielle Gene zu unterbrechen, welche für die Qualität des Produkts verantwortlich sein können, besteht nicht.

Neben neusten Errungenschaften bei der Generierung von Zelllinien u.a. mit der CRISPR/Cas9-Technologie können auch neue Verfahren bei der Isolation von stabilen hochproduzierenden Zellklonen den Prozess der Zelllinienentwicklung beschleunigen. Da es sich in der Regel um ein sehr seltenes Ereignis handelt, einen solchen Zellklon innerhalb eines transfizierten Zellpools ausfindig zu machen, muss eine Vielzahl von Klonen analysiert werden. Normalerweise wird hierfür die Methode der seriellen Verdünnung verwendet. Dieses Verfahren ist zwar einerseits einfach zu handhaben, benötigt jedoch sehr viel Zeit und einen hohen Arbeitsaufwand und kann unter Umständen ebenfalls hohe Kosten verursachen. Um Monoklonalität zu gewährleisten sind oft mehrere Runden der Subklonierung erforderlich (Anne Underwood and Bean, 1988). Viel wichtiger ist dabei jedoch die Bestimmung der Produktivität der einzelnen Zellklone, was meist durch den Einsatz von ELISA umgesetzt wird.

Fortschritte auf dem Gebiet der Screening-Technologie können den Zeit- und Arbeitsaufwand, um einen hochproduzierenden Zellklon zu identifizieren, erheblich verringern. Dazu zählt u.a. die Fluoreszenz-basierte Zellsortierung (FACS). Dabei ist die Präzision hohe Produzentenzellen ausfindig zu machen abhängig von dem Fluoreszenzsignal der Zelle. Daher ist dieses Verfahren v.a. für die Selektion von Zellen geeignet, welche ein intrazelluläres rekombinantes Protein exprimieren (Meng *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2001). Es gibt mittlerweile jedoch auch Verfahren um hoch produzierende Zellen zu selektieren, welche das rekombinante Protein sekretieren. Bei dem *gel microdrop secretion assay* (Gray *et al.* 1995; Powell & Weaver 1990), wird das sekretierte Protein durch fluoreszenzmarkierte immobilisierte Antikörper gebunden, wodurch sowohl die Zelle als auch das sekretierte Protein in dem Mikrotropfen verbleiben und mit Hilfe von FACS isoliert werden können. Daneben gibt es noch weitere Methoden, wie die *affinity matrix attachment method* (Manz *et al.*, 1995; Holmes and Al-Rubeai, 1999) oder die *cold capture method* (Brezinsky *et al.*, 2003), welche auf ähnlichen Prinzipien beruhen und die Isolation von Klonen mit einer 20-fach höheren Produktivität ermöglichen.

Neben FACS-basierter Einzelzellsortierung, die nicht bei allen Zelltypen erfolgreich verläuft, gibt es auch die Möglichkeit automatisierte Robotersysteme wie das ClonePix FL System (Genetix, Sunnyvale, CA, USA) zu verwenden, welches in der Lage ist, in kürzester Zeit, große Mengen an Klonen zu analysieren und zu vereinzeln. Dabei können innerhalb von einer Stunde bis zu 10 000 Zellen einzeln betrachtet und die 0,003 % der am höchsten exprimierten Klone isoliert werden (Dharshanan *et al.*, 2011).

Literatur

- Aaltonen, J., Björres, P., Perheentupa, J., Horelli-Kuitunen, N., Palotie, A., Peltonen, L., Lee, Y. S., Francis, F., Henning, S., Thiel, C., Leharach, H. and Yaspo, M. (1997) 'An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 17(4), pp. 399–403.
- Abremski, K., Hoess, R. and Sternberg, N. (1983) 'Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination.', *Cell*, 32(4), pp. 1301–11.
- Aggarwal, S. (Rob) (2012) 'What's fueling the biotech engine – 2011 to 2012', *Nature Biotechnology*. Nature Research, 30(12), pp. 1191–1197.
- Alt, A., Miguel-Romero, L., Donderis, J., Aristorena, M., Blanco, F. J., Round, A., Rubio, V., Bernabeu, C. and Marina, A. (2012) 'Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding.', *PloS one*. Public Library of Science, 7(2), p. e29948..
- Andersen, C. B. F., Madsen, M., Storm, T., Moestrup, S. K. and Andersen, G. R. (2010) 'Structural basis for receptor recognition of vitamin-B12-intrinsic factor complexes', *Nature*, 464(7287), pp. 445–448.
- Andersen, D. C. and Krummen, L. (2002) 'Recombinant protein expression for therapeutic applications', *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), pp. 117–123.
- Andrews, B. J., Proteau, G. A., Beatty, L. G. and Sadowski, P. D. (1985) 'The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences.', *Cell*, 40(4), pp. 795–803.
- Anne Underwood, P. and Bean, P. A. (1988) 'Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas', *Journal of Immunological Methods*, 107(1), pp. 119–128.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. and Sharon, N. (1999) 'On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database.', *Biochimica et biophysica acta*, 1473(1), pp. 4–8.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. and Pedersen, J. (2006) 'Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins', *Protein Expression and Purification*, 48(1), pp. 1–13.
- Astley, K. and Al-Rubeai, M. (2008) 'The role of Bcl-2 and its combined effect with p21CIP1 in adaptation of CHO cells to suspension and protein-free culture', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(3), pp. 391–399.
- Ausubel Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., F. M. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De Jesus, M. and Wurm, F. M. (2008) 'Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under

- serum-free conditions', *Nucleic Acids Research*, 36(15), pp. e96–e96.
- Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De Jesus, M. and Wurm, F. M. (2008) 'Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 36(15), p. e96.
- Baer, A. and Bode, J. (2001) 'Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes', *Current Opinion in Biotechnology*, 12(5), pp. 473–480.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) 'Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 22(11), pp. 1399–1408.
- Baser, B. (2015). New Strategies to improve the expression of recombinant mammalian proteins in engineered animal cell lines. Doktorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Bashaw, J. M. and Yates, J. L. (2001) 'Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires exact spacing of two bound dimers of EBNA1 which bend DNA.', *Journal of virology*, 75(22), pp. 10603–11.
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. and Liu, J.-L. (2013) 'Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System', *Cell Reports*, 4(1), pp. 220–228.
- Bebbington, C. R., Renner, G., Thomson, S., King, D., Abrams, D. and Yarranton, G. T. (1992) 'High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker.', *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 10(2), pp. 169–75.
- Beerli, R. R., Dreier, B. and Barbas, C. F. (2000) 'Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), pp. 1495–1500.
- Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B. and Barbas, C. F. (1998) 'Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp. 14628–33.
- Bell, A. C., West, A. G. and Felsenfeld, G. (1999) 'The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators.', *Cell*, 98(3), pp. 387–96.
- Belteki, G., Gertsenstein, M., Ow, D. W. and Nagy, A. (2003) 'Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing *phiC31* integrase.', *Nature biotechnology*, 21(3), pp. 321–4.
- Benton, T., Chen, T., McEntee, M., Fox, B., King, D., Crombie, R., Thomas, T. C. and Bebbington, C. (2002) 'The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein.', *Cytotechnology*, 38(1/3), pp. 43–46.

- Berger, I., Fitzgerald, D. J. and Richmond, T. J. (2004) 'Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes', *Nature Biotechnology*, 22(12), pp. 1583–1587.
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R. and Cullen, B. R. (1988) 'Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells.', *Gene*, 66(1), pp. 1–10.
- Bhakta, M. S., Henry, I. M., Ousterout, D. G., Das, K. T., Lockwood, S. H., Meckler, J. F., Wallen, M. C., Zykovich, A., Yu, Y., Leo, H., Xu, L., Gersbach, C. A. and Segal, D. J. (2013) 'Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly.', *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 23(3), pp. 530–8.
- Blau, N., van Spronsen, F. J. and Levy, H. L. (2010) 'Phenylketonuria', *The Lancet*. Elsevier, 376(9750), pp. 1417–1427.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. (2009) 'Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors', *Science*, 326(5959), pp. 1509–1512.
- Bode, J., Schlake, T., Iber, M., Schübeler, D., Seibler, J., Snezhkov, E. and Nikolaev, L. (2000) 'The Transgeneticists Toolbox: Novel Methods for the Targeted Modification of Eukaryotic Genomes', *Biological Chemistry*, 381(9–10), pp. 801–13.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995) 'A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), pp. 7297–301.
- Boussif, O., Zanta, M. A. and Behr, J. P. (1996) 'Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold.', *Gene therapy*, 3(12), pp. 1074–80.
- Bouvier, N. M. and Palese, P. (2008) 'The biology of influenza viruses.', *Vaccine*, 26 Suppl 4, pp. D49–53.
- Branda, C. S. and Dymecki, S. M. (2004) 'Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice.', *Developmental cell*, 6(1), pp. 7–28.
- Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C., Gardam, M. and Wu, M. (2007) 'Transmission of influenza A in human beings.', *The Lancet. Infectious diseases*. Health Canada, Ottawa, 7(4), pp. 257–65.
- Brezinsky, S. C. G., Chiang, G. G., Szilvasi, A., Mohan, S., Shapiro, R. I., MacLean, A., Sisk, W. and Thill, G. (2003) 'A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity.', *Journal of immunological methods*, 277(1–2), pp. 141–55.
- Briggs, A. W., Rios, X., Chari, R., Yang, L., Zhang, F., Mali, P. and Church, G. M. (2012) 'Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers', *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp. e117–e117.
- Brondyk, W. H. (2009) 'Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a

- Recombinant Protein', in *Methods in Enzymology*, pp. 131–147.
- Buchholz, F., Angrand, P.-O. and Stewart, A. F. (1998) 'Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis', *Nature Biotechnology*, 16(7), pp. 657–662.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F. and Stewart, A. F. (1996) 'Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 24(21), pp. 4256–62.
- Burda, P. and Aebi, M. (1999) 'The dolichol pathway of N-linked glycosylation.', *Biochimica et biophysica acta*, 1426(2), pp. 239–57.
- Büssow, K. (2015) 'Stable mammalian producer cell lines for structural biology', *Current Opinion in Structural Biology*, 32(Table 1), pp. 81–90.
- Butters, T. D., Sparks, L. M., Harlos, K., Ikemizu, S., Stuart, D. I., Jones, E. Y. and Davis, S. J. (1999) 'Effects of N -butyldeoxynojirimycin and the Lec3.2.8.1 mutant phenotype on N-glycan processing in Chinese hamster ovary cells: Application to glycoprotein crystallization', *Protein Science*, 8(8), pp. 1696–1701.
- Capecchi, M. R. (2005) 'Essay: Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century', *Nature Reviews Genetics*, 6(6), pp. 507–512.
- Carroll, D. (2011) 'Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases', *Genetics*, 188(4), pp. 773–782.
- Carroll, D. (2014) 'Genome engineering with targetable nucleases.', *Annual review of biochemistry*, 83(February), pp. 409–39.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. (2011) 'Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting', *Nucleic Acids Research*, 39(12), pp. e82–e82.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. (1994) 'Green fluorescent protein as a marker for gene expression.', *Science (New York, N.Y.)*, 263(5148), pp. 802–5.
- Chang, V. T., Crispin, M., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Nettleship, J. E., Fennelly, J. A., Yu, C., Boles, K. S., Evans, E. J., Stuart, D. I., Dwek, R. A., Jones, E. Y., Owens, R. J. and Davis, S. J. (2007) 'Glycoprotein Structural Genomics: Solving the Glycosylation Problem', *Structure*, 15(3), pp. 267–273.
- Chasin, L. and Urlaub, G. (1975) 'Chromosome-wide event accompanies the expression of recessive mutations in tetraploid cells', *Science*, 187(4181).
- Chen, X., Xu, F., Zhu, C., Ji, J., Zhou, X., Feng, X. and Guang, S. (2014) 'Dual sgRNA-directed gene knockout using CRISPR/Cas9 technology in *Caenorhabditis elegans*.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 4, p. 7581.
- Cho, K. J., Hong, K. W., Kim, S.-H., Seok, J. H., Kim, S., Lee, J.-H., Saelens, X. and Kim, K. H. (2014) 'Insight into Highly Conserved H1 Subtype-Specific Epitopes in Influenza Virus Hemagglutinin', *PLoS ONE*. Edited by E. N. Miyaji. Public

- Library of Science, 9(2), p. e89803.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S. and Kim, J.-S. (2014) 'Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases.', *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 24(1), pp. 132–41.
- Chu, L. and Robinson, D. K. (2001) 'Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.', *Current opinion in biotechnology*, 12(2), pp. 180–7.
- Cinatl, J., Cinatl, J., Driever, P. H., Kotchetkov, R., Pouckova, P., Kornhuber, B. and Schwabe, D. (1997) 'Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells.', *Anti-cancer drugs*, 8(10), pp. 958–63.
- Clayton, A., Siebold, C., Gilbert, R. J. C., Sutton, G. C., Harlos, K., McIlhinney, R. A. J., Jones, E. Y. and Aricescu, A. R. (2009) 'Crystal Structure of the GluR2 Amino-Terminal Domain Provides Insights into the Architecture and Assembly of Ionotropic Glutamate Receptors', *Journal of Molecular Biology*, 392(5), pp. 1125–1132.
- Cobellis, G., Nicolaus, G., Iovino, M., Romito, A., Marra, E., Barbarisi, M., Sardiello, M., Di Giorgio, F. P., Iovino, N., Zollo, M., Ballabio, A. and Cortese, R. (2005) 'Tagging genes with cassette-exchange sites.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 33(4), p. e44.
- Cockett, M. I., Bebbington, C. R. and Yarranton, G. T. (1990) 'High Level Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification', *Bio/Technology*. Nature Publishing Group, 8(7), pp. 662–667.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. and Helling, R. B. (1973) 'Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), pp. 3240–4.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. and Zhang, F. (2013) 'Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems', *Science*, 339(6121), pp. 819–823.
- Cooper, G. M. (2000) *The cell : a molecular approach*. ASM Press.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) 'FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).', *Gene*, 173(1 Spec No), pp. 33–8.
- Coroadinha, A. S., Schucht, R., Gama-Norton, L., Wirth, D., Hauser, H. and Carrondo, M. J. T. (2006) 'The use of recombinase mediated cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency by transgene exchange.', *Journal of biotechnology*, 124(2), pp. 457–68.
- Corsica, C. D. and Howard, B. H. (1990) 'Chloramphenicol Acetyltransferase as a Reporter in Mammalian Gene Transfer', in *Animal Cell Culture*. New Jersey: Humana Press, pp. 589–596.
- Cost, G. J., Freyvert, Y., Vafiadis, A., Santiago, Y., Miller, J. C., Rebar, E., Collingwood, T. N., Snowden, A. and Gregory, P. D. (2010) 'BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells',

- Biotechnology and Bioengineering*, 105(2), pp. 330–340.
- Crispin, M., Bowden, T. A., Coles, C. H., Harlos, K., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Stuart, D. I. and Jones, E. Y. (2009) 'Carbohydrate and Domain Architecture of an Immature Antibody Glycoform Exhibiting Enhanced Effector Functions', *Journal of Molecular Biology*, 387(5), pp. 1061–1066.
- Crispin, M., Harvey, D. J., Chang, V. T., Yu, C., Aricescu, A. R., Jones, E. Y., Davis, S. J., Dwek, R. A. and Rudd, P. M. (2006) 'Inhibition of hybrid- and complex-type glycosylation reveals the presence of the GlcNAc transferase I-independent fucosylation pathway.', *Glycobiology*, 16(8), pp. 748–56.
- Cullen, B. R. (2000) '[11] Utility of the secreted placental alkaline phosphatase reporter enzyme', in, pp. 159–164.
- Dalton, A. C. and Barton, W. A. (2014) 'Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines.', *Protein science: a publication of the Protein Society*. Wiley-Blackwell, 23(5), pp. 517–25.
- Damasceno, L. M., Huang, C.-J. and Batt, C. A. (2012) 'Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), pp. 31–39. doi: 10.1007/s00253-011-3654-z.
- Davis, S. J. and Crispin, M. (2010) 'Solutions to the Glycosylation Problem for Low- and High-Throughput Structural Glycoproteomics', in *Functional and Structural Proteomics of Glycoproteins*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 127–158.
- Davis, S. J., Ikemizu, S., Collins, A. V., Fennelly, J. A., Harlos, K., Jones, E. Y. and Stuart, D. I. (2001) 'Crystallization and functional analysis of a soluble deglycosylated form of the human costimulatory molecule B7-1.', *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 57(Pt 4), pp. 605–8.
- Davis, S. J., Puklavec, M. J., Ashford, D. A., Harlos, K., Jones, E. Y., Stuart, D. I. and Williams, A. F. (1993) 'Expression of soluble recombinant glycoproteins with predefined glycosylation: application to the crystallization of the T-cell glycoprotein CD2.', *Protein engineering*, 6(2), pp. 229–32.
- Dean, D. A., Dean, B. S., Muller, S. and Smith, L. C. (1999) 'Sequence Requirements for Plasmid Nuclear Import', *Experimental Cell Research*, 253(2), pp. 713–722.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J.-K., Shi, Y. and Yan, N. (2012) 'Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors', *Science*, 335(6069), pp. 720–723.
- Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M. and Wurm, F. M. (2004) 'Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells', *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), pp. 537–545.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P. and Moineau, S. (2008) 'Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 190(4), pp. 1390–400.
- Dharshanan, S., Chong, H., Hung, C. S., Zamrod, Z. and Kamal, N. (2011) 'Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized

- monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity', *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(2).
- Dias, J. M., Losberger, C., Déruaz, M., Power, C. A., Proudfoot, A. E. I. and Shaw, J. P. (2009) 'Structural Basis of Chemokine Sequestration by a Tick Chemokine Binding Protein: The Crystal Structure of the Complex between Evasin-1 and CCL3', *PLoS ONE*. Edited by A. Hofmann. Public Library of Science, 4(12), p. e8514.
- Dickinson, D. J. and Goldstein, B. (2016) 'CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering.', *Genetics*. Genetics Society of America, 202(3), pp. 885–901.
- Dreesen, I. A. J. and Fussenegger, M. (2011) 'Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of chinese hamster ovary cells', *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), pp. 853–866.
- Dreier, B., Beerli, R. R., Segal, D. J., Flippin, J. D. and Barbas, C. F. (2001) 'Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors', *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), pp. 29466–29478.
- Durocher, Y. (2006) 'Expression vectors containing a truncated epstein barr nuclear antigen 1 lacking the Gly-Gly-Ala domain for enhanced transient gene expression'.
- Durocher, Y., Perret, S. and Kamen, A. (2002) 'High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells.', *Nucleic acids research*, 30(2), p. E9.
- Dyson, M. R. (2016) 'Fundamentals of Expression in Mammalian Cells', in: Springer International Publishing, pp. 217–224.
- Emerman, M. and Temin, H. M. (1984) 'Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism.', *Cell*, 39(3 Pt 2), pp. 449–67.
- Fágáin, C. Ó. (1995) 'Understanding and increasing protein stability', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1252(1), pp. 1–14.
- Fan, G., Wang, Z., Hao, M. and Li, J. (2015) 'Bispecific antibodies and their applications.', *Journal of hematology & oncology*. BioMed Central, 8, p. 130.
- Fan, Q. R. and Hendrickson, W. A. (2005) 'Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor', *Nature*, 433(7023), pp. 269–277.
- Fischer, N., Kremmer, E., Lautscham, G., Mueller-lantzsch, N., Grässer, F. A. and Gra, F. A. (1997) 'Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin alpha2.', *The Journal of biological chemistry*, 272(7), pp. 3999–4005.
- Fischer, P. B., Karlsson, G. B., Dwek, R. A. and Platt, F. M. (1996) 'N-butyldeoxynojirimycin-mediated inhibition of human immunodeficiency virus

- entry correlates with impaired gp120 shedding and gp41 exposure.', *Journal of virology*, 70(10), pp. 7153–60.
- Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M. and Martin, D. I. . (1999) 'A Functional Enhancer Suppresses Silencing of a Transgene and Prevents Its Localization Close to Centromeric Heterochromatin', *Cell*, 99(3), pp. 259–269.
- Franek, F., Hohenwarter, O. and Katinger, H. (2000) 'Plant Protein Hydrolysates: Preparation of Defined Peptide Fractions Promoting Growth and Production in Animal Cells Cultures', *Biotechnology Progress*. American Chemical Society, 16(5), pp. 688–692.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. and Joung, J. K. (2014) 'Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs', *Nature Biotechnology*. Nature Research, 32(3), pp. 279–284.
- Gagneux, P. and Varki, A. (1999) 'Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function.', *Glycobiology*, 9(8), pp. 747–55.
- Gaj, T. (2014) 'ZFN, TALEN and CRISPR/Cas based methods for genome engineering', 2013, 31(7), pp. 397–405.
- Galloway, S. E., Reed, M. L., Russell, C. J. and Steinhauer, D. A. (2013) 'Influenza HA Subtypes Demonstrate Divergent Phenotypes for Cleavage Activation and pH of Fusion: Implications for Host Range and Adaptation', *PLoS Pathogens*. Edited by Y. Kawaoka, 9(2), p. e1003151.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I. K. and Whitelaw, E. (1998) 'Repeat-induced gene silencing in mammals', *Nature Genetics*, 18(1), pp. 56–59.
- Gill, D. R., Pringle, I. A. and Hyde, S. C. (2009) 'Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors.', *Gene therapy*. Macmillan Publishers Limited, 16(2), pp. 165–71.
- Girod, P.-A., Nguyen, D.-Q., Calabrese, D., Puttini, S., Grandjean, M., Martinet, D., Regamey, A., Saugy, D., Beckmann, J. S., Bucher, P. and Mermod, N. (2007) 'Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells', *Nature Methods*, 4(9), pp. 747–753.
- Girod, P.-A., Zahn-Zabal, M. and Mermod, N. (2005) 'Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines', *Biotechnology and Bioengineering*, 91(1), pp. 1–11.
- Godbey, W. T., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (1999) 'Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 96(9), pp. 5177–81.
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A. D. (1979) 'Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), pp. 106–10.
- Gomord, V., Fitchette, A.-C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D. and Faye, L. (2010) 'Plant-specific glycosylation patterns in the

- context of therapeutic protein production', *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), pp. 564–587.
- Gonzalez, B., Schwimmer, L. J., Fuller, R. P., Ye, Y., Asawapornmongkol, L., Barbas, C. F. and III (2010) 'Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins.', *Nature protocols*. NIH Public Access, 5(4), pp. 791–810.
- Gould, S. J. and Subramani, S. (1988) 'Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology.', *Analytical biochemistry*, 175(1), pp. 5–13.
- Gray, F., Kenney, J. S. and Dunne, J. F. (1995) 'Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells.', *Journal of immunological methods*, 182(2), pp. 155–63.
- Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B. and Calos, M. P. (2000) 'A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(11), pp. 5995–6000.
- Ha, Y., Stevens, D. J., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (2001) 'X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), pp. 11181–11186.
- Harrison, R. L. and Jarvis, D. L. (2006) 'Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce "Mammalianized" Recombinant Glycoproteins', in *Advances in virus research*, pp. 159–191.
- Hay, A. J., Gregory, V., Douglas, A. R. and Lin, Y. P. (2001) 'The evolution of human influenza viruses.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 356(1416), pp. 1861–70.
- Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. (1994) 'Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 91(26), pp. 12501–4.
- Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996) 'Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer.', *Current biology : CB*, 6(2), pp. 178–82.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) 'Intracellular functions of N-linked glycans.', *Science (New York, N.Y.)*, 291(5512), pp. 2364–9.
- Hitchman, R. B., Possee, R. D. and King, L. A. (2009) 'Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells.', *Recent patents on biotechnology*, 3(1), pp. 46–54.
- Hocine, S., Singer, R. H. and Grunwald, D. (2010) 'RNA Processing and Export', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), pp. a000752–a000752.
- Holmes, P. and Al-Rubeai, M. (1999) 'Improved cell line development by a high throughput affinity capture surface display technique to select for high secretors.', *Journal of immunological methods*, 230(1–2), pp. 141–7.

- Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) 'CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.', *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), pp. 167–170.
- Huang, Y., Li, Y., Wang, Y. G., Gu, X., Wang, Y. and Shen, B. F. (2007) 'An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression', *Journal of Immunological Methods*, 322(1–2), pp. 28–39.
- Huh, S.-H., Do, H.-J., Lim, H.-Y., Kim, D.-K., Choi, S.-J., Song, H., Kim, N.-H., Park, J.-K., Chang, W.-K., Chung, H.-M. and Kim, J.-H. (2007) 'Optimization of 25kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery', *Biologicals*, 35(3), pp. 165–171.
- Hunt, I. (2005) 'From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression', *Protein Expression and Purification*, 40(1), pp. 1–22.
- Hwang, S. O. and Lee, G. M. (2009) 'Effect of Akt overexpression on programmed cell death in antibody-producing Chinese hamster ovary cells', *Journal of Biotechnology*, 139(1), pp. 89–94.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J. and Joung, J. K. (2013) 'Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system', *Nature Biotechnology*, 31(3), pp. 227–229.
- Isalan, M. (2011) 'Zinc-finger nucleases: how to play two good hands', *Nature Methods*. Nature Research, 9(1), pp. 32–34.
- Jadhav, V., Hackl, M., Druz, A., Shridhar, S., Chung, C.-Y., Heffner, K. M., Kreil, D. P., Betenbaugh, M., Shiloach, J., Barron, N., Grillari, J. and Borth, N. (2013) 'CHO microRNA engineering is growing up: Recent successes and future challenges', *Biotechnology Advances*, 31(8), pp. 1501–1513.
- Jäger, V., Büsow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A. and Schirrmann, T. (2013) 'High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells.', *BMC biotechnology*, 13, p. 52.
- James, R. I., Elton, J. P., Todd, P. and Kompala, D. S. (2000) 'Engineering CHO cells to overexpress a secreted reporter protein upon induction from mouse mammary tumor virus promoter.', *Biotechnology and bioengineering*, 67(2), pp. 134–40.
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W. S. and Yap, M. G. S. (2007) 'Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting', *Chemical Engineering Progress*. American Institute of Chemical Engineers, 103(10), pp. 40–47.
- Jayapal, K., Wlaschin, K., Hu, W. and Yap, G. (2007) 'Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting', *Chemical Engineering Progress*, 103(10), pp. 40–47.
- Jefferson, T., Del Mar, C. B., Dooley, L., Ferroni, E., Al-Ansary, L. A., Bawazeer, G. A., van Driel, M. L., Nair, S., Jones, M. A., Thorning, S. and Conly, J. M. (2011) 'Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses', in Jefferson, T. (ed.) *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E.

- (2012) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816–821.
- Jones, C. H., Hayward, S. D. and Rawlins, D. R. (1989) 'Interaction of the lymphocyte-derived Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 with its DNA-binding sites.', *Journal of virology*, 63(1), pp. 101–10.
- Jost, J. P., Oakeley, E. J., Zhu, B., Benjamin, D., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, Y. C. (2001) '5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 29(21), pp. 4452–61.
- Kaufman, R. J., Wasley, L. C., Spiliotes, A. J., Gossels, S. D., Latt, S. A., Larsen, G. R. and Kay, R. M. (1985) 'Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells.', *Molecular and cellular biology*, 5(7), pp. 1750–9.
- Kaufman, W. L., Kocman, I., Agrawal, V., Rahn, H.-P., Besser, D. and Gossen, M. (2008) 'Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 36(17), pp. e111–e111.
- Khan, K. H. (2013) 'Gene expression in Mammalian cells and its applications.', *Advanced pharmaceutical bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences, 3(2), pp. 257–63.
- Kim, J.-M., Kim, J.-S., Park, D.-H., Kang, H. S., Yoon, J., Baek, K. and Yoon, Y. (2004) 'Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions.', *Journal of biotechnology*, 107(2), pp. 95–105.
- Kim, J. Do, Yoon, Y., Hwang, H.-Y., Park, J. S., Yu, S., Lee, J., Baek, K. and Yoon, J. (2008) 'Efficient Selection of Stable Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell Lines for Expression of Recombinant Proteins by Using Human Interferon β SAR Element', *Biotechnology Progress*, 21(3), pp. 933–937.
- Kim, M. S. and Lee, G. M. (2008) 'Use of Flp-mediated cassette exchange in the development of a CHO cell line stably producing erythropoietin.', *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(7), pp. 1342–51.
- Kim, N. S., Kim, S. J. and Lee, G. M. (1998) 'Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: Stability in the absence of selective pressure', *Biotechnology and Bioengineering*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 60(6), pp. 679–688.
- Kim, S., Lee, M. J., Kim, H., Kang, M. and Kim, J.-S. (2011) 'Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs', *Nature Methods*, 8(1), pp. 7–7.
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J. K., Yoo, J. Y., Kim, H. J., Kim, S., Lee, C., Jeong, E., Chung, E., Kim, D., Lee, M. S., Go, E. M., Song, H. J., Kim, H., Cho, N., Bang, D., Kim, S. and Kim, J.-S. (2013) 'A library of TAL effector nucleases spanning the human genome', *Nature Biotechnology*. Nature Research, 31(3), pp. 251–258.
- Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T. and Göttlicher, M. (2003) 'The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation

- of HDAC2.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 22(13), pp. 3411–20.
- Kumasaka, T., Aritake, K., Ago, H., Irikura, D., Tsurumura, T., Yamamoto, M., Miyano, M., Urade, Y., Hayaishi, O. and Lopez, R. (2009) 'Structural basis of the catalytic mechanism operating in open-closed conformers of lipocalin type prostaglandin D synthase.', *The Journal of biological chemistry*. Portland Press Limited, 284(33), pp. 22344–52.
- Kuriakose, A., Chirmule, N. and Nair, P. (2016) 'Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications.', *Journal of immunology research*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, p. 1298473.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Desjardins, E., Robinson, J., Culp, J. S., Hellmig, B. D., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (1999) 'Probability analysis of variational crystallization and its application to gp120, the exterior envelope glycoprotein of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1).', *The Journal of biological chemistry*, 274(7), pp. 4115–23.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) 'Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.', *Journal of biochemical and biophysical methods*, 10(3–4), pp. 203–9.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature*, 227(5259), pp. 680–5.
- Lai, T., Yang, Y. and Ng, S. K. (2013) 'Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production.', *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 6(5), pp. 579–603.
- Landgraf, K. (2015). Optimierung und Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden für CHO-Zellen. Bachelorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Längle-Rouault, F., Patzel, V., Benavente, A., Taillez, M., Silvestre, N., Bompard, A., Sczakiel, G., Jacobs, E. and Rittner, K. (1998) 'Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids.', *Journal of virology*, 72(7), pp. 6181–5.
- Larsen, M. R., Sørensen, G. L., Fey, S. J., Larsen, P. M. and Roepstorff, P. (2001) 'Phospho-proteomics: Evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis', *PROTEOMICS*, 1(2), pp. 223–238.
- Lebkowski, J. S., Clancy, S. and Calos, M. P. (1985) 'Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression.', *Nature*, 317(6033), pp. 169–71.
- Lee, J. E., Fusco, M. L. and Ollmann Saphire, E. (2009) 'An efficient platform for screening expression and crystallization of glycoproteins produced in human cells', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 4(4), pp. 592–604.
- Lee, J. S., Kallehauge, T. B., Pedersen, L. E. and Kildegaard, H. F. (2015) 'Site-specific

- integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway', pp. 1–11. doi: 10.1038/srep08572.
- Lehner, R., Wang, X. and Hunziker, P. (2013) 'Plasmid linearization changes shape and efficiency of transfection complexes', *European Journal of Nanomedicine*, 5(4), pp. 205–212.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A. C., Gomord, V. and Faye, L. (1998) 'N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends.', *Plant molecular biology*, 38(1–2), pp. 31–48.
- Lewis, N. E., Liu, X., Li, Y., Nagarajan, H., Yerganian, G., O'Brien, E., Bordbar, A., Roth, A. M., Rosenbloom, J., Bian, C., Xie, M., Chen, W., Li, N., Baycin-Hizal, D., Latif, H., Forster, J., Betenbaugh, M. J., Famili, I., Xu, X., Wang, J. and Palsson, B. O. (2013) 'Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome', *Nature Biotechnology*, 31(8), pp. 759–765.
- Li, H. L., Gee, P., Ishida, K. and Hotta, A. (2016) 'Efficient genomic correction methods in human iPS cells using CRISPR–Cas9 system', *Methods*, 101, pp. 27–35.
- Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R. (1998) 'Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*', *Current Opinion in Biotechnology*, 9(5), pp. 497–501.
- Lin, J. H., Wang, M., Andrews, W. H., Wydro, R. and Morser, J. (1994) 'Expression efficiency of the human thrombomodulin-encoding gene in various vector and host systems.', *Gene*, 147(2), pp. 287–92.
- Lindner, S. E. and Sugden, B. (2007) 'The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells.', *Plasmid*, 58(1), pp. 1–12.
- Liu, Q., Segal, D. J., Ghiara, J. B. and Barbas, C. F. (1997) 'Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), pp. 5525–30.
- Liu, W., Xiong, Y. and Gossen, M. (2006) 'Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. Springer Berlin / Heidelberg, 84(1), pp. 57–64.
- Liu, Z., Hui, Y., Shi, L., Chen, Z., Xu, X., Chi, L., Fan, B., Fang, Y., Liu, Y., Ma, L., Wang, Y., Xiao, L., Zhang, Q., Jin, G., Liu, L. and Zhang, X. (2016) 'Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Versatile, Predictable, and Donor-Free Gene Knockout in Human Pluripotent Stem Cells.', *Stem cell reports*. Elsevier, 7(3), pp. 496–507.
- Lombardo, A., Cesana, D., Genovese, P., Di Stefano, B., Provasi, E., Colombo, D. F., Neri, M., Magnani, Z., Cantore, A., Lo Riso, P., Damo, M., Pello, O. M., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Gritti, A., Broccoli, V., Bonini, C. and Naldini, L. (2011) 'Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer', *Nature Methods*, 8(10), pp. 861–869.
- Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. A., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2014) 'Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA', *Science*, 345(6201), pp. 1184–1188.
- Lynch, J. and Walsh, E. (2007) 'Influenza: Evolving Strategies in Treatment and

- Prevention', *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. Copyright © 2007 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 28(2), pp. 144–158.
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J. D., Voytas, D. F. and Joung, J. K. (2009) 'Oligomerized pool engineering (OPEN): an "open-source" protocol for making customized zinc-finger arrays.', *Nature protocols*. NIH Public Access, 4(10), pp. 1471–501.
- Mak, A. N.-S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. and Stoddard, B. L. (2012) 'The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target.', *Science*, 335(6069), pp. 716–9.
- Maksimenko, O., Gasanov, N. B. and Georgiev, P. (2015) 'Regulatory Elements in Vectors for Efficient Generation of Cell Lines Producing Target Proteins.', *Acta naturae*. Park Media, 7(3), pp. 15–26.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M. (2013) 'RNA-guided human genome engineering via Cas9.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 339(6121), pp. 823–6.
- Manz, R., Assenmacher, M., Pflüger, E., Miltenyi, S. and Radbruch, A. (1995) 'Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 92(6), pp. 1921–5.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M. and Porro, D. (2012) 'Recombinant Protein Production in Yeasts', in, pp. 329–358.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. and Lukyanov, S. A. (1999) 'Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.', *Nature Biotechnology*, 17(10), pp. 969–973.
- McBurney, M. W., Mai, T., Yang, X. and Jardine, K. (2002) 'Evidence for Repeat-Induced Gene Silencing in Cultured Mammalian Cells: Inactivation of Tandem Repeats of Transfected Genes', *Experimental Cell Research*, 274(1), pp. 1–8.
- McManus, M. T. and Sharp, P. A. (2002) 'Gene silencing in mammals by small interfering RNAs', *Nature Reviews Genetics*, 3(10), pp. 737–747.
- Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K. and Wurm, F. M. (2001) 'Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells.', *Biotechnology and bioengineering*, 75(2), pp. 197–203.
- Meng, Y. G., Liang, J., Wong, W. L. and Chisholm, V. (2000) 'Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells.', *Gene*, 242(1–2), pp. 201–7.
- Meyer, S. (2012). Development of an integrated expression platform for protein production in eukaryotic hosts. Doktorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Meyer, S., Lorenz, C., Baser, B., Wördehoff, M., Jäger, V. and van den Heuvel, J. (2013) 'Multi-host expression system for recombinant production of challenging

- proteins.', *PloS one*, 8(7), p. e68674.
- Mirkovitch, J., Mirault, M. E. and Laemmli, U. K. (1984) 'Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold.', *Cell*, 39(1), pp. 223–32.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Almendros, C. (2009) 'Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system', *Microbiology*. Microbiology Society, 155(3), pp. 733–740.
- Moolten, F. L. (1986) 'Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy.', *Cancer research*, 46(10), pp. 5276–81.
- Moscou, M. J. and Bogdanove, A. J. (2009) 'A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors', *Science*, 326(5959), pp. 1501–1501.
- Nakamura, T. and Omasa, T. (2015) 'Optimization of cell line development in the GS-CHO expression system using a high-throughput, single cell-based clone selection system', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(3), pp. 323–329.
- Nehlsen, K., Schucht, R., da Gama-Norton, L., Krömer, W., Baer, A., Cayli, A., Hauser, H. and Wirth, D. (2009) 'Recombinant protein expression by targeting pre-selected chromosomal loci.', *BMC biotechnology*, 9, p. 100.
- Nettleship, J. (2012) 'Structural Biology of Glycoproteins', *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, pp. 41–62.
- Newell-Price, J., Clark, A. J., King, P., (2000) 'DNA methylation and silencing of gene expression.', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. Elsevier, 11(4), pp. 142–8.
- Noguchi, S. and Satow, Y. (2006) 'Purification of Human 2-Adrenergic Receptor Expressed in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*', *Journal of Biochemistry*, 140(6), pp. 799–804.
- North, S. J., Huang, H.-H., Sundaram, S., Jang-Lee, J., Etienne, A. T., Trollope, A., Chalabi, S., Dell, A., Stanley, P. and Haslam, S. M. (2010) 'Glycomics Profiling of Chinese Hamster Ovary Cell Glycosylation Mutants Reveals N-Glycans of a Novel Size and Complexity', *Journal of Biological Chemistry*, 285(8), pp. 5759–5775.
- O'Gorman, S., Fox, D. and Wahl, G. (1991) 'Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells', *Science*, 251(4999), pp. 1351–1355.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J. (1996) 'Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.', *Science (New York, N.Y.)*, 273(5280), pp. 1392–5.
- Oumard, A., Qiao, J., Jostock, T., Li, J. and Bode, J. (2006) 'Recommended Method for Chromosome Exploitation: RMCE-based Cassette-exchange Systems in Animal Cell Biotechnology.', *Cytotechnology*. Springer, 50(1–3), pp. 93–108.
- Parker, C. E., Mocanu, V., Mocanu, M., Dicheva, N. and Warren, M. R. (2010) *Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications, Neuroproteomics*. CRC Press/Taylor & Francis.

- Pasupuleti, V. K., Holmes, C. and Demain, A. L. (2008) 'Applications of Protein Hydrolysates in Biotechnology', in *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1-9.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A. and Liu, D. R. (2013) 'High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity', *Nature Biotechnology*. Nature Research, 31(9), pp. 839-843.
- Pham, P. L., Perret, S., Doan, H. C., Cass, B., St-Laurent, G., Kamen, A. and Durocher, Y. (2003) 'Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency', *Biotechnology and Bioengineering*, 84(3), pp. 332-342.
- de Poorter, J. J., Lipinski, K. S., Nelissen, R. G. H. H., Huizinga, T. W. J. and Hoeben, R. C. (2007) 'Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and ubiquitous chromatin opening elements (UCOE)', *The Journal of Gene Medicine*, 9(8), pp. 639-648.
- Powell, K. T. and Weaver, J. C. (1990) 'Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population.', *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 8(4), pp. 333-7.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992) 'Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.', *Gene*, 111(2), pp. 229-33.
- PUCK, T. T., CIECIURA, S. J. and ROBINSON, A. (1958) 'Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.', *The Journal of experimental medicine*, 108(6), pp. 945-56.
- Qiao, J., Oumard, A., Wegloehner, W. and Bode, J. (2009) 'Novel tag-and-exchange (RMCE) strategies generate master cell clones with predictable and stable transgene expression properties.', *Journal of molecular biology*. Elsevier Inc., 390(4), pp. 579-94.
- Ramakrishna, S., Cho, S. W., Kim, S., Song, M., Gopalappa, R., Kim, J.-S. and Kim, H. (2014) 'Surrogate reporter-based enrichment of cells containing RNA-guided Cas9 nuclease-induced mutations', *Nature Communications*, 5, p. 3378.
- Ramsland, P. A., Farrugia, W., Bradford, T. M., Sardjono, C. T., Esparon, S., Trist, H. M., Powell, M. S., Tan, P. S., Cendron, A. C., Wines, B. D., Scott, A. M. and Hogarth, P. M. (2011) 'Structural Basis for Fc RIIa Recognition of Human IgG and Formation of Inflammatory Signaling Complexes', *The Journal of Immunology*, 187(6), pp. 3208-3217.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. and Zhang, F. (2013) 'Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity.', *Cell*. NIH Public Access, 154(6), pp. 1380-9.
- Ran, F., Hsu, P., Wright, J. and Agarwala, V. (2013) 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nature protocols*, 8(11), pp. 2281-308.
- Raymond, C. S. and Soriano, P. (2007) 'High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific

- recombination in mammalian cells.', *PloS one*, 2(1), p. e162.
- Reisman, D., Yates, J. and Sugden, B. (1985) 'A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components.', *Molecular and cellular biology*, 5(8), pp. 1822-32.
- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D. and Joung, J. K. (2012) 'FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing.', *Nature biotechnology*. NIH Public Access, 30(5), pp. 460-5.
- Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2014) 'Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 5, p. 172.
- Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A. and Dwek, R. A. (2001) 'Glycosylation and the Immune System', *Science*, 291(5512).
- Sakaguchi, M., Watanabe, M., Kinoshita, R., Kaku, H., Ueki, H., Futami, J., Murata, H., Inoue, Y., Li, S.-A., Huang, P., Putranto, E. W., Ruma, I. M. W., Nasu, Y., Kumon, H. and Huh, N.-H. (2014) 'Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene.', *Molecular biotechnology*. Springer, 56(7), pp. 621-30.
- Sambrook, J. and D.W.Russell (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, J. D. and Joung, J. K. (2014) 'CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes.', *Nature biotechnology*. Nature Publishing Group, 32(4), pp. 347-55.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1988) 'Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), pp. 5166-70.
- Sawin, K. E. and Scholey, J. M. (1991) 'Motor proteins in cell division.', *Trends in cell biology*, 1(5), pp. 122-9.
- Schimke, R. T., Persico, M., Martin, R. G., Dunbar, B. S., Riser, M. E., Siciliano, M. J., Kellems, R. E., Rubnitz, J., Stark, G. and Vitto, L. (1984) 'Gene amplification in cultured animal cells.', *Cell*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 37(3), pp. 705-13.
- Schlake, T. and Bode, J. (1994) 'Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci.', *Biochemistry*, 33(43), pp. 12746-51.
- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Höning, K. and Hornung, V. (2012) 'A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes', *Nature Biotechnology*, 31(1), pp. 76-81.
- Schübeler, D., Maass, K. and Bode, J. (1998) 'Retargeting of Retroviral Integration Sites for the Predictable Expression of Transgenes and the Analysis of Cis-Acting Sequences 1', *Biochemistry*, 37(34), pp. 11907-11914.
- Schucht, R., Coroadinha, a S., Zanta-Boussif, M. a, Verhoeven, E., Carrondo, M. J. T., Hauser, H. and Wirth, D. (2006) 'A new generation of retroviral producer cells:

- predictable and stable virus production by Flp-mediated site-specific integration of retroviral vectors.', *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(2), pp. 285–92.
- Schucht, R., Lydford, S., Andzinski, L., Zauers, J., Cooper, J., Hauser, H., Wirth, D. and May, T. (2011) 'Rapid establishment of G-protein-coupled receptor-expressing cell lines by site-specific integration.', *Journal of biomolecular screening*. SAGE Publications, 16(3), pp. 323–31.
- Segal, D. J., Dreier, B., Beerli, R. R. and Barbas, C. F. (1999) 'Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp. 2758–63.
- Seiradake, E., Coles, C. H., Perestenko, P. V., Harlos, K., McIlhinney, R. A. J., Aricescu, A. R. and Jones, E. Y. (2011) 'Structural basis for cell surface patterning through NetrinG-NGL interactions', *The EMBO Journal*, 30(21), pp. 4479–4488.
- Senecoff, J. F. and Cox, M. M. (1986) 'Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing.', *The Journal of biological chemistry*, 261(16), pp. 7380–6.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2004) 'Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein', *Nature Biotechnology*, 22(12), pp. 1567–1572.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. a, Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2004) 'Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.', *Nature biotechnology*, 22(12), pp. 1567–72.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X. and Skarnes, W. C. (2014) 'Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects', *Nature Methods*. Nature Research, 11(4), pp. 399–402.
- Shi, S., Condon, R. G. G., Deng, L., Saunders, J., Hung, F., Tsao, Y.-S. and Liu, Z. (2011) 'A High-throughput Automated Platform for the Development of Manufacturing Cell Lines for Protein Therapeutics', *Journal of Visualized Experiments*, (55).
- Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saiga, Y. (1962) 'Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.', *Journal of cellular and comparative physiology*, 59, pp. 223–39.
- Singh, V., Braddick, D. and Dhar, P. K. (2017) 'Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology', *Gene*, 599, pp. 1–18.
- Southern, P. J. and Berg, P. (1982) 'Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter.', *Journal of molecular and applied genetics*, 1(4), pp. 327–41.
- Stanley, P. (1989) 'Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation

- defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity.', *Molecular and cellular biology*, 9(2), pp. 377–83.
- Stanley, P., Caillibot, V. and Siminovitch, L. (1975) 'Selection and characterization of eight phenotypically distinct lines of lectin-resistant Chinese hamster ovary cell.', *Cell*, 6(2), pp. 121–8.
- Steinhauer, D. A. (1999) 'Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus', *Virology*, 258(1), pp. 1–20.
- Stevens, J., Corper, A. L., Basler, C. F., Taubenberger, J. K., Palese, P. and Wilson, I. A. (2004) 'Structure of the Uncleaved Human H1 Hemagglutinin from the Extinct 1918 Influenza Virus', *Science*, 303(5665).
- Stura, E. A., Nemerow, G. R. and Wilson, I. A. (1992) 'Strategies in the crystallization of glycoproteins and protein complexes', *Journal of Crystal Growth*, 122(1–4), pp. 273–285.
- Suzuki, Y. (2005) 'Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses.', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(3), pp. 399–408.
- Takata, Y., Kondo, S., Goda, N., Kanegae, Y. and Saito, I. (2011) 'Comparison of efficiency between FLPe and Cre for recombinase-mediated cassette exchange in vitro and in adenovirus vector production', *Genes to Cells*, 16(7), pp. 765–777.
- Thomas, M. and Klivanov, A. M. (2002) 'Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp. 14640–5.
- Thyagarajan, B. and Calos, M. P. (2005) 'Site-specific integration for high-level protein production in mammalian cells.', *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). New Jersey: Humana Press, 308, pp. 99–106.
- Thyagarajan, B., Guimarães, M. J., Groth, A. C. and Calos, M. P. (2000) 'Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites.', *Gene*, 244(1–2), pp. 47–54.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S. and Calos, M. P. (2001) 'Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 21(12), pp. 3926–34.
- Toledo, F., Liu, C.-W., Lee, C. J. and Wahl, G. M. (2006) 'RMCE-ASAP: a gene targeting method for ES and somatic cells to accelerate phenotype analyses', *Nucleic Acids Research*, 34(13), pp. e92–e92.
- Tom, R., Bisson, L. and Durocher, Y. (2008) 'Transfection of HEK293-EBNA1 Cells in Suspension with Linear PEI for Production of Recombinant Proteins.', *CSH protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008(3), p. pdb.prot4977.
- Turan, S., Galla, M., Ernst, E., Qiao, J., Voelkel, C., Schiedlmeier, B., Zehe, C. and Bode, J. (2011) 'Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges.', *Journal of molecular biology*, 407(2), pp. 193–221.
- Turan, S., Kuehle, J., Schambach, A., Baum, C. and Bode, J. (2010) 'Multiplexing RMCE: versatile extensions of the FLP-recombinase-mediated cassette-exchange

- technology.', *Journal of molecular biology*, 402(1), pp. 52–69.
- Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) 'Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 77(7), pp. 4216–20.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. and Gregory, P. D. (2010) 'Genome editing with engineered zinc finger nucleases', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(9), pp. 636–646.
- Valderrama-Rincon, J. D., Fisher, A. C., Merritt, J. H., Fan, Y.-Y., Reading, C. A., Chhibi, K., Heiss, C., Azadi, P., Aebi, M. and DeLisa, M. P. (2012) 'An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*', *Nature Chemical Biology*. Nature Research, 8(5), pp. 434–436.
- Varki, A. (1993) 'Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.', *Glycobiology*, 3(2), pp. 97–130.
- Varki, A. (2011) 'Evolutionary Forces Shaping the Golgi Glycosylation Machinery: Why Cell Surface Glycans Are Universal to Living Cells', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), pp. a005462–a005462.
- Varki, A. and Sharon, N. (2009) *Historical Background and Overview, Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Verhoeven, E., Hauser, H. and Wirth, D. (2001) 'Evaluation of retroviral vector design in defined chromosomal loci by Flp-mediated cassette replacement.', *Human gene therapy*, 12(8), pp. 933–44.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004) 'Cancer genes and the pathways they control', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 10(8), pp. 789–799.
- Wagner, R., Matrosovich, M. and Klenk, H.-D. (2002) 'Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections', *Reviews in Medical Virology*, 12(3), pp. 159–166.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013) 'One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering', *Cell*, 153(4), pp. 910–918. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- Wang, W., Sun, X., Li, Y., Su, J., Ling, Z., Zhang, T., Wang, F., Zhang, H., Chen, H., Ding, J. and Sun, B. (2016) 'Human antibody 3E1 targets the HA stem region of H1N1 and H5N6 influenza A viruses', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 13577.
- Wang, X., Cao, C., Huang, J., Yao, J., Hai, T., Zheng, Q., Wang, X., Zhang, H., Qin, G., Cheng, J., Wang, Y., Yuan, Z., Zhou, Q., Wang, H. and Zhao, J. (2016) 'One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 20620.
- Wells, E. and Robinson, A. S. (2017) 'Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement', *Biotechnology Journal*. WILEY-VCH Verlag, 12(1), p. 1600105.

- Whitelaw, E., Sutherland, H., Kearns, M., Morgan, H., Weaving, L. and Garrick, D. (2001) 'Epigenetic Effects on Transgene Expression', in *Gene Knockout Protocols*. New Jersey: Humana Press, pp. 351–368.
- Wilke, S., Groebe, L., Maffenbeier, V., Jäger, V., Gossen, M., Josewski, J., Duda, A., Polle, L., Owens, R. J., Wirth, D., Heinz, D. W., van den Heuvel, J. and Büssow, K. (2011) 'Streamlining homogeneous glycoprotein production for biophysical and structural applications by targeted cell line development.', *PloS one*, 6(12), p. e27829.
- Wilke, S., Krausze, J., Gossen, M., Groebe, L., Jäger, V., Gherardi, E., van den Heuvel, J. and Büssow, K. (2010) 'Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting.', *Protein science : a publication of the Protein Society*, 19(6), pp. 1264–71.
- Wilson, I. A., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1981) 'Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.', *Nature*, 289(5796), pp. 366–73.
- Wilson, I. B., Zeleny, R., Kolarich, D., Staudacher, E., Stroop, C. J., Kamerling, J. P. and Altmann, F. (2001) 'Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha1,3-linked fucose and xylose substitutions.', *Glycobiology*, 11(4), pp. 261–74.
- Wong, E. T., Kolman, J. L., Li, Y.-C., Mesner, L. D., Hillen, W., Berens, C. and Wahl, G. M. (2005) 'Reproducible doxycycline-inducible transgene expression at specific loci generated by Cre-recombinase mediated cassette exchange', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 33(17), pp. e147–e147.
- Wulhfard, S., Baldi, L., Hacker, D. L. and Wurm, F. (2010) 'Valproic acid enhances recombinant mRNA and protein levels in transiently transfected Chinese hamster ovary cells', *Journal of Biotechnology*, 148(2), pp. 128–132.
- Wurm, F. M. (2004) 'Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.', *Nature biotechnology*, 22(11), pp. 1393–8.
- Wurm, F. M., Gwinn, K. A. and Kingston, R. E. (1986) 'Inducible overproduction of the mouse c-myc protein in mammalian cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(15), pp. 5414–8.
- Würtele, H., Little, K. C. E. and Chartrand, P. (2003) 'Illegitimate DNA integration in mammalian cells', *Gene Therapy*, 10(21), pp. 1791–1799.
- Wysokenski, D. A. and Yates, J. L. (1989) 'Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus.', *Journal of virology*, 63(6), pp. 2657–66.
- Xiao-Jie, L., Hui-Ying, X., Zun-Ping, K., Jin-Lian, C. and Li-Juan, J. (2015) 'CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy', *Journal of Medical Genetics*, 52(5), pp. 289–296.
- Xing, Z., Kenty, B. M., Li, Z. J. and Lee, S. S. (2009) 'Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors', *Biotechnology and Bioengineering*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 103(4), pp. 733–746.

- Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., Chen, W., Xie, M., Wang, W., Hammond, S., Andersen, M. R., Neff, N., Passarelli, B., Koh, W., Fan, H. C., Wang, J., Gui, Y., Lee, K. H., Betenbaugh, M. J., Quake, S. R., Famili, I., Palsson, B. O. and Wang, J. (2011) 'The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line', *Nature Biotechnology*, 29(8), pp. 735–741.
- Xue, H.-Y., Zhang, X., Wang, Y., Xiaojie, L., Dai, W.-J. and Xu, Y. (2016) 'In vivo gene therapy potentials of CRISPR-Cas9', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 23(7), pp. 557–559.
- Yan, Q., Zhang, Q., Yang, H., Zou, Q., Tang, C., Fan, N. and Lai, L. (2014) 'Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system', *Cell Regeneration*, 3(1), p. 3:12.
- Yates, J. L., Warren, N., Sugden, B., Iwakiri, D. and Takada, K. (2007) 'Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells.', *Nature*. The Company of Biologists Ltd, 313(6005), pp. 812–5.
- Ye, J., Alvin, K., Latif, H., Hsu, A., Parikh, V., Whitmer, T., Tellers, M., de la Cruz Edmonds, M. C., Ly, J., Salmon, P. and Markusen, J. F. (2010) 'Rapid protein production using CHO stable transfection pools', *Biotechnology Progress*, 26(5), pp. 1431–1437.
- Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Ogura, Y., Oi, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M. and Suga, K. (2000) 'Amplified Gene Location in Chromosomal DNA Affected Recombinant Protein Production and Stability of Amplified Genes', *Biotechnology Progress*, 16(5), pp. 710–715.
- Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Ogura, Y., Oi, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M. and Suga, K. I. (2001) 'Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry.', *Biotechnology and bioengineering*, 74(5), pp. 435–42.
- Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S. and Yang, S.-H. (2015) 'Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering', *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, p. e264.
- Zhu, B., Benjamin, D., Zheng, Y., Angliker, H., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, J. P. (2001) 'Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 98(9), pp. 5031–6.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Joop van den Heuvel bedanken, der mir die Chance gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und es mir ermöglichte, Doktorarbeit und Familienleben zu vereinen. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihm für die anregenden Diskussionen, das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die Freiheit bei der Planung meiner Experimente.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Dübel, dass er sich bereit erklärt hat meine Promotion als Mentor zu betreuen und mich während der Thesis Committees mit hilfreichen Ideen unterstützt hat. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt und Prof. Dr. Michael Hust für die Übernahme des Koreferates und des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Bahar Baser, Christian Schinkowski und Maren Bleckmann für die kollegiale Unterstützung bei der Bearbeitung von Projekten und die aufbauenden und konstruktiven Gespräche. Vielen Dank, Margitta Schürig, für die vielen spannenden Fortbildungsveranstaltungen mit dir an meiner Seite, die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft im Laboralltag und der tollen Zeit fernab von Vorträgen und Postern u.a. während unseres gemeinsamen Retreats 2016 in Hahnenklee.

Ein herzliches Dankeschön gilt Anke Samuels für ihre emotionale Unterstützung während der letzten zwei Jahre meiner Doktorarbeit. Durch sie habe ich eine wertvolle Freundschaft dazu gewonnen, die ich nicht mehr missen möchte. Ihrem sportlichen Engagement ist es außerdem zu verdanken, dass wir uns jährlich als Team beim Behörden-Staffel-Marathon unter Beweis stellen durften.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Manfred Nimtz für die Einführung in die Massenspektrometrie und die Auswertung meiner Daten bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Peer Lukat und Dr. Stefan Schmelz für Ihre Hilfe bei der Proteinreinigung, Kristallisation und die vielen netten Gespräche bedanken. Ein weiterer Dank gilt Dr. Konrad Büssow für seine konstruktiven Ideen während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir jederzeit mit Geduld und liebevoller Unterstützung zur Seite standen und mich auf meinem Weg begleitet haben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Ehemann Steffen und meinen beiden Töchtern für die uneingeschränkte Liebe und die wertvolle Zeit fernab der Promotion bedanken.